

**MOLEKULARBIOLOGISCHE UND KLINISCHE ASPEKTE
DER ANDROGENREGULATION :
HORMONEFFEKTE IN ZELLKULTUR UND
KLONIERUNG EINER cDNA FÜR
DAS PROSTATA - SPEZIFISCHE ANTIGEN .**

PETER SCHULZ

1988

Disbui. München

1988





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554823_0130

Molekularbiologische und klinische Aspekte der Androgen-
regulation: Hormoneffekte in Zellkultur und Klonierung
einer cDNA für das Prostata-spezifische Antigen.

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades des
Fachbereiches Biologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Peter Schulz
aus Olching

München 1988

vorgelegt am 14. März 1988

1. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Kaudewitz

2. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Gutensohn

Sondervotum: Prof. Dr. F. Fittler

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Juli 1988

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie und Zellbiologie der Universität München in der Zeit von Februar 1981 bis Dezember 1987 durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. H. G. Zachau danke ich für die Förderung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. F. Fittler für die Vermittlung des Themas und seine engagierte Unterstützung.

Allen Kollegen, besonders Rolf Stucka, danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden teilweise veröffentlicht:

P. Schulz, H.W. Bauer und F. Fittler, Biol. Chem. Hoppe-Seyler 366, 1033-1039 (1985)

P. Schulz, I. Vetter, H.W. Bauer und F. Fittler, Urologia Internationalis 43, Suppl. 1 (1988)

P. Schulz, H.W. Bauer, W.P. Brade, A. Keller und F. Fittler, Cancer Res. 48, 2867-2870 (1988)

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einleitung und Problemstellung.....	1
2.	Ergebnisse.....	6
2.1.	Steroidregulation der PAP-Expression in LNCaP-Zellen.....	6
2.1.1.	Natürliche und synthetische Androgene stimulieren die PAP-Synthese in LNCaP-Zellen.....	7
2.1.2.	Das synthetische Androgen R1881 hemmt die Proliferation von LNCaP-Zellen.....	10
2.1.3.	Hohe Konzentrationen des weiblichen Sexualhormons Östradiol stimulieren die PAP-Synthese in LNCaP-Zellen.....	12
2.2.	Untersuchung des cytotoxischen Effekts von DES und seinen phosphorylierten Derivaten auf LNCaP und andere Zelllinien.....	13
2.2.1.	Niedrige DES-Konzentrationen haben keinen Einfluß auf die Proliferation von LNCaP-Zellen.....	14
2.2.2.	Hohe Konzentrationen an DES und seinen phosphorylierten Derivaten wirken cyto- toxisch auf LNCaP-Zellen.....	15
2.2.3.	Hohe Konzentrationen an DES und seinen phosphorylierten Derivaten wirken cyto- toxisch auf eine Reihe von Zelllinien aus verschiedenen Geweben.....	16
2.3.	Aufbau einer cDNA-Genbank aus mRNA von androgenstimulierten LNCaP-Zellen im Expressionvektor lambda gt11.....	19
2.3.1.	Präparation der Vektor-DNA und der Verpackungsextrakte.....	20
2.3.2.	Präparation von mRNA.....	22
2.3.2.	Synthese der cDNA und RI-Methylierung.....	23
2.3.4.	Ligierung der cDNA mit synthetischen Eco RI-Linkern, Größenselektion der cDNA und Klonierung in lambda gt11.....	28
2.3.5.	Überprüfung der Länge der klonierten cDNA-Fragmente.....	29

2.4.	Selektion PSA-spezifischer cDNA-Klone mittels Antikörper.....	30
2.5.	Analyse einer PSA-spezifischen cDNA.....	33
2.5.1.	Sequenzierung des codierenden Abschnitts der cDNA.....	34
2.5.2.	Vergleich der aus der Nukleotidsequenz abgeleiteten Aminosäuresequenz mit der veröffentlichten Proteinsequenz.....	36
2.5.3.	Karte des PSA-spezifischen cDNA-Klons.....	39
2.6.	Isolierung weiterer 11 PSA-spezifischer Klone mit Hilfe einer Nukleinsäure-Probe....	39
3.	Diskussion.....	40
3.1.	Ist die LNCaP-Zelllinie geeignet als in vitro Modell eines Prostatakarzinoms?....	40
3.2.	Könnten synthetische Androgene zur Therapie "androgenunabhängiger" Prostatakarzinome eingesetzt werden?.....	42
3.3.	Ist die LNCaP-Zelllinie geeignet als Modell für androgenstimulierbare Genexpression?.....	44
3.4.	Ist die Androgenstimulierung der PAP-Synthese in LNCaP-Zellen ein Artefakt der Zellkultur oder ein Abbild der Genregulation in vivo?.....	45
3.5.	Wie sehen auf Androgene ansprechende Regulationssequenzen aus?.....	47
3.6.	Worauf beruht der therapeutische Effekt hochdosierter DESDP-Infusionen beim fortgeschrittenen Prostatakarzinom?.....	50
3.7.	Zur Qualität der Expressionsgenbank: Lohnt sich weiteres Absuchen?.....	52
4.	Materialien und Methoden.....	55
4.1.	Zellkultur.....	55
4.2.	Tests auf PAP-Synthese und Wachstums- verhalten von LNCaP-Zellen.....	55
4.3.	Tests auf Cytotoxizität von DES und seinen phosphorylierten Derivaten auf Zelllinien aus verschiedenen Geweben.....	56

4.4.	Präparation von Gesamt-RNA und poly A-haltiger RNA.....	57
4.5.	Herstellung und Tests der lambda gt11 Vektor-DNA und der Verpackungsextrakte.....	59
4.6.	Synthese der cDNA.....	61
4.7.	Ligierung der cDNA mit lambda gt11-DNA.....	67
4.8.	Absuchen der Expressionsgenbank mit PSA- und PAP-spezifischen Antikörpern.....	67
4.9.	Umklonieren in M13, Sequenzierung und Sequenzvergleich.....	69
4.10.	Hybridisierung mit PSA-spezifischer cDNA....	70
5.	Zusammenfassung.....	71
6.	Literaturverzeichnis.....	75
7.	Abkürzungen.....	81

Lebenslauf

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Die Regulation physiologischer Vorgänge durch Steroidhormone stellt ein entwicklungsgeschichtlich sehr altes Prinzip dar. Von den Pilzen bis zu den Säugetieren reicht die Palette der Organismen, bei denen Steroidhormone an der Steuerung der Zelldifferenzierung, der Induktion gewebsspezifischer Proteinsynthese sowie an der Aufrechterhaltung funktioneller steroidabhängiger Gewebe beteiligt sind (1). Die zeitliche Abfolge der Ausbildung und Rückbildung definierter Puffs auf den Riesenchromosomen von *Drosophila*-Larven während der Induktion der Verpuppung durch Ecdysteroide ist das vielleicht bestuntersuchte Beispiel einer koordinierten Kaskade von Genaktivierungen im Zuge eines steroidinduzierten Differenzierungsvorgangs (2, 3). Strenge Gewebsspezifität kennzeichnet die Hormonregulation der Synthese vieler in großen Mengen sezernierter Proteine. Das Hauptprotein des Hühnereiklars, Ovalbumin, wird selektiv im Eileiter des Huhns durch Östradiol induziert, während die Östrogen-Stimulation von Vitellogenin, dem Vorläufer der wichtigsten Eigelb-Proteine, ausschließlich in der Leber erfolgt. Steroidabhängige Gewebe verkümmern nach Hormonentzug, wie z.B. die Prostata nach Kastration erwachsener männlicher Säugetiere.

Den vielfältigen Wirkungen der Steroidhormone liegt aus heutiger Sicht ein einheitlicher molekularer Mechanismus zugrunde. Steroidspezifische Rezeptorproteine binden das Hormon und besetzen im Chromatin regulatorische Elemente in der Nähe steroidgesteuerter Gene, meist in deren 5'-Flanke. Die Rezeptorproteine für Östradiol, Glucocorticoide und Progesteron enthalten einen konservierten Abschnitt von etwa 60-70 Aminosäuren, der für die Wechselwirkung mit der DNA verantwortlich ist, sowie eine stärker divergente hormonspezifische Domäne am Carboxylende (4). Die mit Hormon-Rezeptor-Komplexen besetzten

regulatorischen Chromosomenabschnitte wirken als bedeutende Verstärker der Genexpression, sog. Enhancer. Die Lage, Ausdehnung und Nukleotidsequenz steroidabhängiger Enhancer wurden beispielsweise am Maus-Brustkrebs-Virus (MMTV) (5) und am Metallothionein II_A-Gen (6) eingehend studiert. In der Bindungsstelle für den Glucocorticoid-Rezeptor wurde das stark konservierte Hexanukleotid 5'-TGT(T/C)CT-3' gefunden (7). DNAase I hypersensitive Stellen im Chromatin der 5'-Flanken einiger steroidregulierter Gene wurden mit funktionell bedeutsamen Rezeptor-Bindungsstellen in Zusammenhang gebracht (8, 9, 10).

Die Wirkungsweise von Androgenen ist auf molekularer Ebene wesentlich weniger gut erforscht als die der Östrogene, Progestine und Glukokortikoide. Ein Grund dafür liegt in der ausgeprägten Proteaseempfindlichkeit des Androgenrezeptors (11).

Aus Nagetieren sind eine Reihe androgenregulierter Gene kloniert worden. Das C3-Gen codiert für eine Untereinheit des steroidbindenden Proteins aus der Prostata der Ratte. Die Bindungsstellen für den Androgen-Rezeptor-Komplex in der 5'-Flanke des C3-Gens konnten grob lokalisiert werden (11). Funktionelle Tests zur Feinkartierung der vermuteten regulatorischen Abschnitte blieben jedoch erfolglos.

Beim Menschen sind die auf Androgene ansprechenden Sequenzen noch unbekannt. Von den drei wesentlichen sekretorischen Proteinen der menschlichen Prostata wurde das Gen für das alpha-Mikrosemينoprotein kloniert (12). Die beiden anderen, das Prostata-spezifische Antigen oder PSA (13) und die Prostata-spezifische Saure Phosphatase oder PAP (14) wurden auf Proteinebene charakterisiert. PAP ist ein dimeres Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 100 kD. Seine N-terminale Aminosäuresequenz wurde bestimmt (14). PSA gehört in die Familie der Serinproteasen. Die 240 Aminosäuren des reifen Proteins wurden sequenziert (13). Zur Untersuchung der Androgenregulation der PAP-Synthese wurden in bisherigen Versu-

chen Gewebestücke verwendet, die bei chirurgischen Eingriffen anfielen (15). Dieses Material ist aber mit derzeitigen Methoden nicht für längere Inkubationen und vor allem nicht zum Studium der Zellproliferation geeignet. Zellkulturen aus Prostatakarzinomen sind technisch wesentlich leichter in den Griff zu bekommen und dürfen mit allen bekannten Einschränkungen als leicht manipulierbare Modelle authentischer Tumoren gelten. In der vorliegenden Arbeit wurden vor allem LNCaP-Zellen (16, 17) verwendet, die einige Eigenschaften differenzierter Prostataepithelzellen beibehalten haben. Sie produzieren PSA und PAP und sprechen auf Steroidhormone im Medium an. Daneben wurden zu Vergleichszwecken auch DU 145 und PC-3 eingesetzt. Diese beiden Linien aus Prostatakarzinomen exprimieren das prostataspezifische, mit dem monoklonalen Antikörper KR-P8 reagierende Antigen (18), nicht jedoch PAP und PSA.

Die lindernde Therapie des fortgeschrittenen Prostatakarzinoms zielt auf eine radikale Senkung des Androgenspiegels im Serum der betroffenen Patienten und/oder die vollständige Blockade peripherer Androgenrezeptoren mit Antiandrogenen. Niedrige Serumkonzentrationen an Östrogenen, z.B. 2-3 ng/ml Diethylstilbestrol (DES) reichen aus, um die Ausschüttung an luteinisierendem Hormon aus der Hypophyse so weit zu drosseln, daß die Testosteronbildung im Hoden praktisch zum Erliegen kommt (19). Die Prostata als androgenabhängiges Gewebe und in mehr als der Hälfte der Fälle auch das Karzinom reagieren mit Atrophie und Zelltod. Es kommt zu Rückfällen, die eine cytotoxische Therapie erfordern. Die Hypothese bei der Entwicklung von Diethylstilbestrol-Diphosphat (DESDP) als Therapeutikum war die Freisetzung der Wirkform DES aus der nicht toxischen Transportform DESDP durch Phosphataseaktivität (PAP) auf den Zielzellen. Dadurch sollte zum einen eine sehr hohe Dosierung ermöglicht, zum anderen eine gewisse Zellspezifität des cytotoxischen Effekts erreicht werden (20). In der klinischen Praxis

hat DESDP Erfolge aufzuweisen (21). Die während einer DESDP-Infusion auftretenden Plasmaspiegel von DESDP und seiner Metabolite DESMP, DES und DES-Glukuronid sind mittels HPLC sehr genau bestimmt worden (22). Die Überprüfung des Wirkungsmechanismus von DESDP war an Gewebestücken nicht möglich.

Die Fragestellung der vorliegenden Arbeit war eine mehrfache.

Im Mittelpunkt stand die Klonierung eines androgenregulierten menschlichen Gens als Voraussetzung zur Charakterisierung und funktionellen Untersuchung der für die Androgenregulation verantwortlichen Elemente. Dafür kamen die Gene für PAP und PSA in Frage. Beide Proteine werden von der Prostata ins Seminalplasma sezerniert. In der klinischen Praxis wird der Plasmaspiegel beider Proteine in der Verlaufskontrolle von Prostatakarzinomen als diagnostisches Kriterium verwendet. Die Proteine werden daher in größeren Mengen zur Herstellung spezifischer Antikörper benötigt. Die Klonierung der Gene sollte die Voraussetzung zu ihrer gentechnischen Produktion schaffen.

Die Steroidregulation der PAP-Synthese in LNCaP-Zellen sollte untersucht werden, um die Zelllinie auf ihre Eignung als Modell für androgeninduzierbare Genexpression zu testen.

Nachdem die Androgenregulation der PAP-Produktion gezeigt war, sollte eine cDNA-Genbank ausgehend von mRNA aus androgenstimulierten LNCaP-Zellen im Expressionsvektor lambda gt11 aufgebaut werden.

Im Rahmen einer Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe F. Fittler hatte G. Schneider die Androgenstimulierbarkeit der PSA-Synthese in LNCaP-Zellen nachgewiesen. Da PSA auf Proteinebene besser charakterisiert war als PAP,

sollte aus der lambda gt11 Genbank ein rekombinanter Plaque mit einer PSA-spezifischen cDNA isoliert und mittels Restriktions- und Sequenzanalyse charakterisiert werden.

Im klinisch orientierten Teil der Arbeit sollte geklärt werden, ob DESDP zusätzlich zum hormonellen Effekt (Senkung des Testosteronspiegels) direkte cytostatische oder cytotoxische Effekte auf Prostatakarzinomzellen ausübt. Dadurch könnte die therapeutische Wirkung von DESDP-Infusionen erklärt werden. Die Verfügbarkeit von Prostatakarzinom-Zelllinien ermöglichte die Untersuchung cytotoxischer Effekte getrennt von Hormoneffekten. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob DES, DESMP und DESDP in Konzentrationen, wie sie während DESDP-Infusionen im Serum von Patienten auftreten, cytotoxisch auf Prostatakarzinomzellen wirken und ob der Effekt spezifisch für Prostata- bzw. Krebszellen ist.

2. ERGEBNISSE

2.1. Steroidregulation der PAP-Expression in LNCaP-Zellen.

Da ein wesentliches Ziel dieser Arbeit darin bestand, die Voraussetzungen zur Untersuchung der Androgenregulation beim Menschen zu schaffen, mußte zunächst ein geeignetes Zellkultursystem gefunden werden, das auf Androgene anspricht. Nur mit Zellkulturen sind funktionelle Tests auf regulatorische Sequenzen möglich. Über Eigenschaften und Identität einiger angeblich aus menschlichen Prostatakarzinomen stammender Linien finden sich widersprüchliche Angaben (23, 24). So wurden EB 33 und MA 160 nach 3 Kriterien als HeLa-Kulturen eingestuft, die aus einem Cervix-Karzinom stammen. Sie enthalten HeLa-spezifische Markerchromosomen, ihnen fehlt das Y-Chromosom und sie exprimieren das HeLa-spezifische Isoenzym A der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (24). Die Synthese der prostataspezifischen Proteine PSA und PAP konnte nicht nachgewiesen werden. Von allen in Zellkultur gehaltenen menschlichen Prostatakarzinomzellen synthetisiert laut Literatur LNCaP als einzige PAP und PSA (17). LNCaP besitzt keine HeLa-spezifischen Chromosomen, wohl hingegen das Y-Chromosom. Androgen- und Östrogenrezeptoren wurden mittels Bindungsstudien im Cytosol der Zellen nachgewiesen. Es gab Hinweise, daß sowohl die Zellproliferation als auch die PAP-Synthese in diesen Zellen durch Dihydrotestosteron (DHT) reguliert werden (17). Während der Etablierung der LNCaP-Zelllinie wurde in keinem Stadium eine Kontamination durch Fibroblasten beobachtet (16). Aufgrund all dieser publizierten Eigenschaften der LNCaP-Zelllinie konnte davon ausgegangen werden, daß es sich tatsächlich um Abkömmlinge transformierter Prostataepithelzellen handelt, die die geplanten Experimente zur Erforschung der Androgenregulation erlauben würden. Aufgrund der widersprüchlichen Befunde

zur Identität anderer Linien aus Prostatakarzinomen war es jedoch unumgänglich, die LNCaP-Zelllinie auf PAP-Synthese und Ansprechen auf Androgene zu testen.

2.1.1. Natürliche und synthetische Androgene stimulieren die PAP-Synthese in LNCaP-Zellen.

In einer ersten Versuchsserie wurde der stimulierende Effekt von Testosteron und Dihydrotestosteron (DHT) auf die PAP-Synthese von LNCaP-Zellen verglichen. DHT wird als das aktive Androgen in der Prostata betrachtet (25). Die Menge an PAP im Kulturmedium wurde zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Abb. 1 zeigt den Anstieg der PAP-Menge in Anwesenheit der angegebenen Konzentrationen natürlicher Androgene. Die Wirkung von Testosteron und DHT ist ungefähr gleich. Das Ausmaß der Stimulierung ist dosisabhängig.

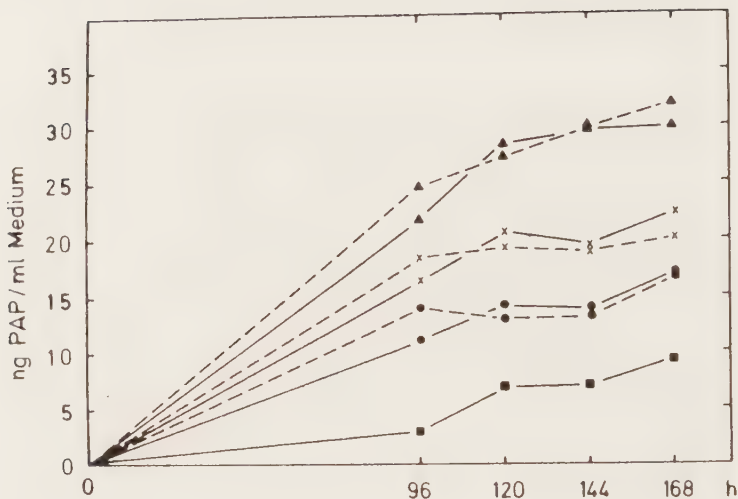


Abb. 1. Testosteron (T) und Dihydrotestosteron (DHT) stimulieren die PAP-Synthese in LNCaP-Zellen.

LNCaP-Zellen wurden angesetzt und mit Hormonen versetzt wie in Material und Methoden beschrieben. Jeder Punkt ist der Mittelwert aus 3 parallel angesetzten Schalen.

- Kontrollen ohne Hormonzusatz
- 10 ng/ml T oder DHT
- × 100 ng/ml T oder DHT
- ▲ 1 µg/ml T oder DHT

Durchgezogene Linie: Testosteron

Gestrichelte Linie : Dihydrotestosteron

Das synthetische Androgen R1881 wurde zur Bestimmung von Androgenrezeptoren entwickelt. Es besitzt eine doppelt so hohe Affinität zum Rezeptor wie wie DHT und wird in Prostatagewebe nicht metabolisiert (27). R1881 stimuliert die PAP-Synthese deutlich effizienter als natürliche Steroide. Schon 10 ng/ml R1881 genügen unter den gewählten Bedingungen für die maximale Induktion (Abb.

2). Selbst eine hundertfach höhere Konzentration natürlicher Androgene konnte die PAP-Synthese nicht im gleichen Ausmaß stimulieren.

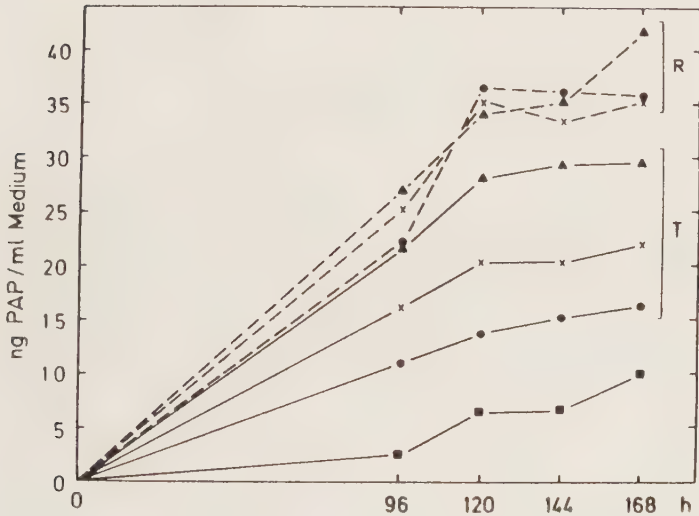


Abb. 2. Das synthetische Androgen R1881 stimuliert die PAP-Synthese in LNCaP-Zellen stärker als Testosteron.

LNCaP-Zellen wurden angesetzt und mit Hormonen versetzt wie in Material und Methoden beschrieben. Jeder Punkt ist der Mittelwert aus 3 parallel angesetzten Schalen.

- Kontrollen ohne Hormonzusatz
- 10 ng/ml Hormon
- x 100 ng/ml Hormon
- ▲ 1 µg/ml Hormon

Obere Kurven: R1881 (R)

Untere Kurven: Testosteron (T)

An sezernierten Hydrolasen aus der Samenblase der Ratte (26) wurde gezeigt, daß Androgene die Freisetzung sekretorischer Proteine aus Speichergranula in der Zelle induzieren können. Um sicher zu gehen, daß es sich bei der ins Medium abgegebenen PAP tatsächlich um neusynthetisiertes Protein handelt, wurde die Menge der in LNCaP-

Zellen gespeicherten PAP gemessen. Sie beträgt etwa $3,8 \text{ ng}/10^6$ Zellen. Innerhalb von 5 Tagen vermehren sich die Zellen in Anwesenheit von R1881 von $1 \cdot 10^6$ auf etwa $3 \cdot 10^6$ und geben ca. 250 ng PAP ins Medium ab. Eine bloße Ausschüttung gespeicherter PAP könnte nicht zu so hohen Konzentrationen an PAP im Medium führen.

2.1.2. Das synthetische Androgen R1881 hemmt die Proliferation von LNCaP-Zellen.

Prostatakarzinomzellen sind in vivo häufig androgenabhängig, d.h. bei Androgenentzug durch Kastration oder androgensupprimierende Therapie wachsen sie deutlich langsamer oder sterben. Änderungen im Wachstumsverhalten von LNCaP-Zellen wurden von Horoszewicz und Mitarbeitern in Aktivkohle-behandeltem, steroidfreiem und in nativem Serum untersucht. Dabei stellte sich heraus, daß das Wachstum der Zellen durch DHT in Aktivkohle-behandeltem Serum stimuliert, in nativem Serum dagegen gehemmt wurde. In den eigenen Versuchen wurde stets natives Serum verwendet, um so nahe wie möglich an der in vivo Situation zu bleiben. Es ist zu befürchten, daß durch Aktivkohle zusammen mit den Steroiden weitere wesentliche Komponenten abgetrennt werden und das Verhalten der Zellen gegenüber dem physiologischen Normalverhalten völlig verfälscht wird. Wie in Abb. 3 gezeigt, führt schon der Zusatz von 10 ng/ml R1881 zu einer Verlangsamung des Wachstums von LNCaP-Zellen. Eine sichtbare Schädigung der Zellen konnte bei keiner der angewandten R1881-Konzentrationen beobachtet werden.

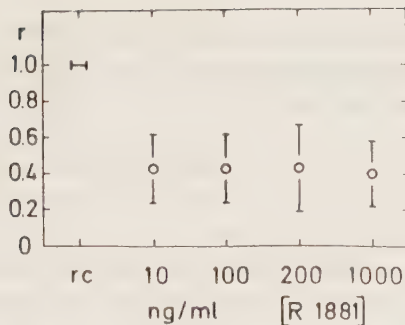


Abb. 3. Das synthetische Androgen R1881 hemmt die Proliferation von LNCaP-Zellen.

LNCaP-Zellen wurden angesetzt und mit Hormonen versetzt wie in Material und Methoden beschrieben. Nach 144 h Inkubation wurden die Zellen trypsiniert und in einer Neubauer-Kammer gezählt. r gibt das Verhältnis (Zellzahl in R1881 enthaltenden Schalen)/(Zellzahl in Kontrollschalen) an. Der r -Wert der Kontrollschalen (rc) ist somit als $1,0 = 100\%$ definiert. Für jede R1881-Konzentration ist der Mittelwert und die Standardabweichung aus 4 unabhängigen Experimenten angegeben.

Ebenso wie bei der Stimulierung der PAP-Synthese ließ sich der R1881-Effekt durch eine Erhöhung der Konzentration auf $1 \mu\text{g/ml}$ nicht mehr steigern. 10 ng/ml liegt im oberen Bereich der physiologischen Testosteronkonzentration im Serum von Männern. Die Untergrenze der wirksamen R1881-Konzentration wurde nicht untersucht. Der zunächst überraschende Befund wurde später mit anderen synthetischen Androgenen, die z.T. noch stärker wachstumshemmend wirken, bestätigt (28 und F. Fittler, Manuskript in Vorbereitung). Natürliche Androgene hemmten die Proliferation nur schwach.

2.1.4. Hohe Konzentrationen des weiblichen Sexualhormons Östradiol stimulieren die PAP-Synthese in LNCaP-Zellen.

Die Hormontherapie des fortgeschrittenen Prostatakarzinoms mit Östrogenen wird weithin angewandt. Es war daher von Interesse, ob Östrogene über die Senkung des Androgenspiegels hinaus auch direkte Effekte auf Prostatakarzinomzellen ausüben. LNCaP-Zellen besitzen Bindungsstellen für Östradiol im Cytoplasma, die allerdings nicht mit dem Rezeptor identisch sein müssen. Das Wachstum von LNCaP-Zellen wurde von 1 $\mu\text{g/ml}$ Östradiol gehemmt, allerdings in geringerem Ausmaß als von R1881. Tote oder geschädigte Zellen wurden nicht beobachtet. Bei 1 $\mu\text{g/ml}$ Östradiol wurde die PAP-Synthese leicht stimuliert (Abb. 4).

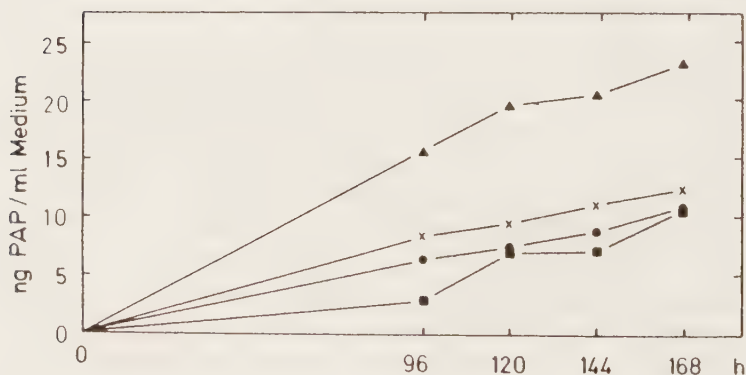


Abb. 4. Das natürliche Steroid Östradiol stimuliert erst in hohen Konzentrationen die PAP-Synthese in LNCaP-Zellen.

LNCaP-Zellen wurden angesetzt und mit Hormonen versetzt wie in Material und Methoden beschrieben. Jeder Punkt ist der Mittelwert aus 3 parallel angesetzten Schalen.

■ Kontrollen ohne Östradiol

● 10 ng/ml Östradiol

x 100 ng/ml Östradiol

▲ 1 $\mu\text{g/ml}$ Östradiol

Wurden R1881 und Östradiol gleichzeitig gegeben, wurde die R1881-bedingte Stimulierung der PAP-Synthese von Östradiol nicht unterdrückt. Eine den Androgenen entgegengesetzte hormonelle Wirkung von Östradiol konnte mit den beschriebenen Versuchen nicht entdeckt werden.

2.2. Untersuchung des cytotoxischen Effekts von DES und seinen phosphorylierten Derivaten auf LNCaP und andere Zelllinien.

Die androgensupprimierende Therapie des Prostatakarzinoms mit Östrogenen, vor allem Diethylstilbestrol (DES), ist eine weithin akzeptierte Behandlungsform. Bei androgenabhängigen Tumoren bewirkt sie oft eine entscheidende Verbesserung der Lebensqualität, birgt allerdings ein beachtliches Risiko für Herzinfarkte, Lungenembolien und Gehirnschläge (29). Fortgeschrittene Tumore oder Rückfälle unter hormoneller Therapie erfordern eine cytotoxische Medikation. Neben klassischen Cytostatika wird beim Prostatakarzinom vor allem die Infusion hoher Dosen DESDP (1,5 g über 3 Stunden, 10 Tage nacheinander) angewandt. Die cytotoxische Wirkform DES soll an Phosphatase-produzierenden Zellen durch Spaltung der Phosphatester aus der nicht-toxischen Transportform DESDP freigesetzt werden. Etwa 60 bis 70% der Patienten reagieren gut bis ausgezeichnet auf die DESDP-Infusionen (21). Die Nebenwirkungen der DESDP-Therapie sind nicht so systematisch untersucht wie die der hormonellen Östrogentherapie. Man darf aber annehmen, daß auch das aus DESDP freigesetzte DES Komplikationen auslösen kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung niedriger und hoher Konzentrationen an DES, DESMP und DESDP auf verschiedene Zelltypen untersucht. Damit sollte vor allem die Zellspezifität eines eventuell nachweisbaren cytotoxischen Effekts abgeschätzt werden. Die Verfügbarkeit einer Phosphatase-produzierenden und zweier Phos-

phatase-negativer Zelllinien aus Prostatakarzinomen bot die Möglichkeit zu testen, inwieweit der cytotoxische Effekt von phosphoryliertem DES von der Phosphataseproduktion der Zielzelle abhängt. Ein Vergleich mit Nicht-Prostata-Zellen zeigt, ob eine besondere Empfindlichkeit der Prostatazellen besteht. Der cytotoxische Wirkungsmechanismus von DES ist bisher unbekannt. Eine eventuelle Zelltypspezifität könnte Hinweise auf den biochemischen Mechanismus der DES-Wirkung geben.

2.2.1. Niedrige DES-Konzentrationen haben keinen Einfluß auf die Proliferation von LNCaP-Zellen.

In einer gängigen Hormontherapie des Prostatakarzinoms werden 3-5 mg/Tag DES oral verabreicht. Dieses Schema führt zu DES-Konzentrationen im Serum der Patienten von 1-4 ng/ml (30). Es wurde zunächst untersucht, ob derart niedrige DES-Spiegel, die im Bereich physiologischer Steroidhormon-Konzentrationen liegen, direkte Effekte auf LNCaP-Zellen ausüben. Wie in Abb. 5 gezeigt, wurde bis 100 ng/ml DES kein Unterschied in der Zellzahl zu unbehandelten Kontrollen gefunden. Auch das Aussehen der Zellen blieb unbeeinflusst.

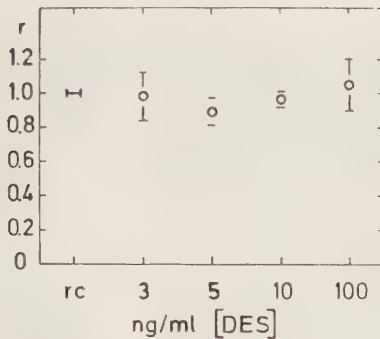


Abb. 5. Niedrige DES-Konzentrationen haben keinen Einfluß auf die Proliferation von LNCaP-Zellen.

LNCaP-Zellen wurden angesetzt und mit Hormonen versetzt wie in Material und Methoden beschrieben. Nach 120 h Inkubation wurden die Zellen trypsiniert und in einer Neubauer-Kammer gezählt. r gibt das Verhältnis (Zellzahl in DES enthaltenden Schalen)/(Zellzahl in Kontrollschalen) an. Der r -Wert der Kontrollschalen (rc) ist somit als $1,0 = 100\%$ definiert. Für jede DES-Konzentration ist der Mittelwert und die Standardabweichung aus 4 unabhängigen Experimenten angegeben.

2.2.2. Hohe Konzentrationen an DES und seinen phosphorylierten Derivaten wirken cytotoxisch auf LNCaP-Zellen.

Die Infusion von 1,5 g DESDP über 3 Stunden führt zu Spitzenkonzentrationen an DESDP von 15–18 $\mu\text{g/ml}$, an DESMP von 14–17 $\mu\text{g/ml}$ und an DES von 2–4 $\mu\text{g/ml}$, also dem Tausendfachen des Plasmaspiegels unter oraler Therapie (22). Schon bei einer Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ DES reagierten LNCaP-Zellen empfindlich. Der cytotoxische Effekt ist klar dosisabhängig. Bei 10 $\mu\text{g/ml}$ DES liegt die Zellzahl nach 5 Tagen Inkubation unter der Ausgangszellzahl. Das bedeutet, daß nicht nur ein wachstumshemmender, sondern ein echter cytotoxischer Effekt vorliegt. Die vielen in Auflösung begriffenen und toten Zellen machen dies augenscheinlich (Abb. 6).

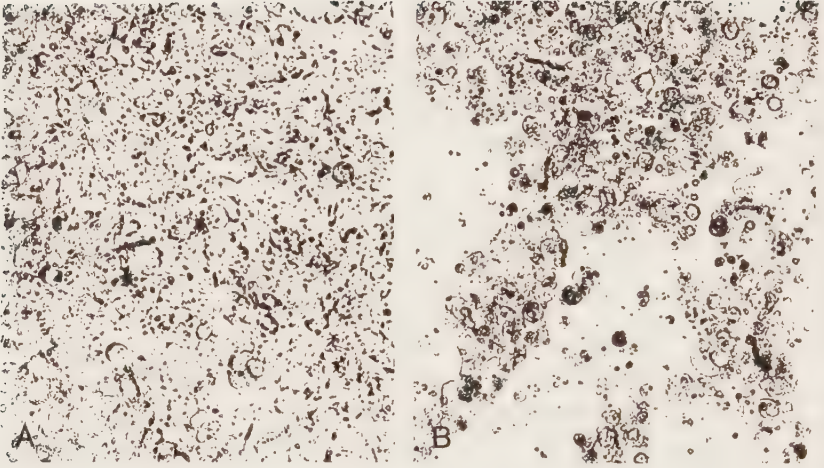


Abb. 6. Hohe DESDP-Konzentrationen wirken cytotoxisch auf LNCaP-Zellen.

A) LNCaP-Zellen nach 19 Tagen Inkubation in Kulturmedium. Die Zellen wachsen mehrschichtig am Boden der Schale.

B) LNCaP-Zellen wie in A), jedoch mit Zusatz von 10 $\mu\text{g/ml}$ DESDP. Die meisten Zellen sind tot oder schwer geschädigt.

2.2.3. Hohe Konzentrationen an DES und seinen phosphorylierten Derivaten wirken cytotoxisch auf eine Reihe von Zelllinien aus verschiedenen Geweben.

Um eine eventuelle Gewebe- oder Zelltypspezifität des cytotoxischen Effekts nachzuweisen, wurden andere menschliche Zelllinien aus Prostatakarzinomen (DU 145 und PC-3), aus einem Blasenkarzinom (EJ) und aus einem Epidermiskarzinom (KB) sowie eine nicht transformierte Linie embryonaler Lungenfibroblasten (MRC-5) auf ihre Empfindlichkeit gegen DES, DESMP und DESDP getestet. Die Ergebnisse in Abb. 7 zeigen, daß alle untersuchten Zelllinien auf hohe Konzentrationen der genannten Substanzen etwa gleich empfindlich reagieren.

Quantitative Unterschiede in der Empfindlichkeit sollten nicht überbetont werden, zumal die Streubreite der Zellzahlen beträchtlich und die Anzahl der durchgeführten Tests begrenzt war. Eine eindeutige Gewebe- oder Zellspezifität des cytotoxischen Effekts konnte nicht gefunden werden.

Abb. 7. DES und seine phosphorylierten Derivate wirken in hohen Konzentrationen cytotoxisch auf eine Reihe von Zelllinien aus verschiedenen Geweben.

Zellen wurden angesetzt und mit Hormonen versetzt wie in Material und Methoden beschrieben. Nach 120 h Inkubation (für MRC-5 144 h) wurden die Zellen trypsiniert und in einer Neubauer-Kammer gezählt. r gibt das Verhältnis (Zellzahl in Hormon enthaltenden Schalen)/(Zellzahl in Kontrollschalen) an. Der r -Wert der Kontrollschalen (r_c) ist somit als $1,0 = 100\%$ definiert. Für jede Hormonkonzentration ist der Mittelwert und die Standardabweichung aus mindestens 4 unabhängigen Experimenten angegeben. Für LNCaP-Zellen wurden 6 bis 11 Experimente durchgeführt.

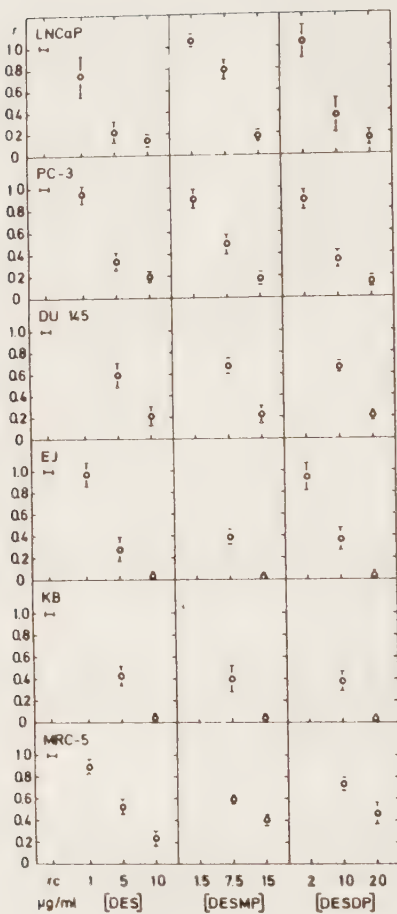


Abb. 7. Legende siehe Seite 17.

Die Phosphatase-produzierenden LNCaP-Zellen waren unter den hier gegebenen Bedingungen nicht empfindlicher gegen DESMP und DESDP als andere transformierte Zellen. Die Phosphatase-Aktivität im nicht inaktivierten fötalen Kälberserum wurde mit p-Nitrophenylphosphat bestimmt. Bei gleicher Aktivität gegen DESDP sollte sie ausreichen, in 24 h 75% der Phosphatester in 20 µg/ml DESDP zu hydrolysieren. Die aus PAP stammende Phosphatase-Aktivität fiel dann nicht mehr ins Gewicht.

Von besonderem Interesse ist das Verhalten der normalen Fibroblasten (MRC-5). Sie starben unter DES weniger rasch als z.B. LNCaP, zeigten aber auffällige morphologische Veränderungen. Zwischen den typischen, spindelförmigen Fibroblasten tauchten Foci vieleckiger, dichtgedrängt wachsender Zellen auf, die in Kontrollschalen niemals zu sehen waren (Abb. 8).

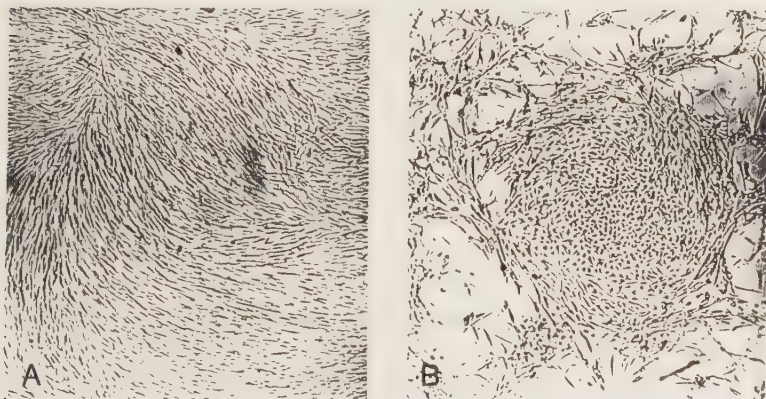


Abb. 8. DES verursacht morphologische Veränderungen bei MRC-5-Zellen.

A) MRC-5-Zellen nach 18 Tagen Wachstum in Kulturmedium. Die Zellen bilden für Fibroblasten typische parallele Anordnungen langgestreckter spindelförmiger Zellen.

B) MRC-5-Zellen wie in A) mit Zusatz von 5 µg/ml DES. Die Zellzahl ist deutlich reduziert. Zwischen den typischen Fibroblasten sind Foci dichtgedrängt wachsender polygonaler Zellen erkennbar.

2.3. Aufbau einer cDNA-Genbank aus mRNA von androgenstimulierten LNCaP-Zellen im Expressionsvektor lambda gt11.

Zur Klonierung eukaryotischer Gene wurde eine Reihe von Strategien entwickelt, die auf der reversen Transkription von mRNA in cDNA und auf der Identifizierung und Selektion gesuchter Klone mittels Antikörpern gegen das Translationsprodukt beruhen. Bei einem solchen Vorgehen ist weder die Kenntnis der Aminosäuresequenz noch der Funktion des Proteins notwendig, dessen Gen kloniert werden soll. Die Selektion, das "Fischen" richtiger Klone geschah anfangs hauptsächlich durch "hybrid selection" (31) oder "hybrid arrested translation". Wesentlich vereinfacht wurde das Auffinden eines gewünschten Klon durch die Entwicklung von Expressionsvektoren, bei denen die cDNA in den Leserahmen eines prokaryotischen Strukturgens eingesetzt wird, das unter der Kontrolle eines leicht an- und abschaltbaren Promotors steht. Der prokaryotische Wirtsorganismus produziert nach Anschalten des Promotors eine große Menge hybrider mRNA und, falls die cDNA richtig im Leseraster sitzt, Hybridprotein, dessen N-Terminus vom prokaryotischen Strukturgen und dessen C-Terminus von der eukaryotischen cDNA codiert wird. Ist die exprimierte eukaryotische Proteindomäne ausreichend groß, kann sie von Antikörpern erkannt und zur Selektion richtiger Klone benutzt werden. Das in dieser Arbeit verwendete Wirt-Vektor-System lambda gt11/Y 1088 soll kurz vorgestellt werden (32, 33). Das Phagen genom enthält eine Kopie des lac Z (β -Galaktosidase) Gens einschließlich des Operators. Zur Klonierung fremder DNA, z.B. eukaryotischer cDNA, dient die einzige Eco RI-Stelle im gesamten Phagen genom 53 Basenpaare stromauf des lac Z-Stopcodons. DNA Fragmente bis 8 kb können über Eco RI-Enden kloniert werden. Eine Insertion im lac Z Strukturgen zerstört die Funktion der β -Galaktosidase. Rekombinante Plaques sind daher leicht daran zu erkennen, daß sie auf X-gal-Agarplatten keinen blauen

Farbstoff produzieren können. Wenn die cDNA in der richtigen Orientierung und im richtigen Leseraster der β -Galaktosidase eingebaut ist, wird ein hybrides Protein synthetisiert, dessen C-Terminus von der cDNA codiert ist. Der Promotor des lac Z-Gens gehört zu den stärksten in *E. coli*. Würde er sofort nach Infektion der Bakterienzelle mit dem Phagen aktiv, würde so viel Hybridprotein gemacht, daß die Phagensynthese beeinträchtigt würde. Daher enthalten die Wirtsstämme Y 1088 und Y 1090 das Plasmid pMC 9 (34), das das funktionelle Gen für den lac-Repressor trägt. Dieser unterdrückt die Transkription vom lac Z-Promotor fast vollständig. Das Anschalten des Promotors geschieht durch IPTG, ein nicht hydrolysierbares Analog der Laktose, das an den Repressor bindet und ihn inaktiviert. Y 1088 und Y 1090 unterscheiden sich im wesentlichen in zwei Enzymen: Y 1088 besitzt keine *E. coli* K spezifische Restriktionsnuklease, wohl aber die entsprechende Methylase, bei Y 1090 fehlt die lon-Protease. Es empfiehlt sich daher, die cDNA-Bank zunächst in Y 1088 zu etablieren und in Y 1090 zu amplifizieren und mit Antikörpern nach gewünschten Klonen zu suchen. Das Hybridprotein wird durch phageninduzierte Lyse in nativer Form aus den Wirtsbakterien freigesetzt. Eine denaturierende Vorbehandlung mit SDS wie bei Expressionsplasmiden entfällt (35).

2.3.1. Präparation der Vektor-DNA und der Verpackungsextrakte.

In 1-Liter-Kolben wurden Bakterien (Y 1088 oder Y 1090) und Phagen im Verhältnis 100:1 bis 1000:1 angeimpft, z.B. 10^9 Bakterien mit 10^6 bis 10^7 Phagen. Dieses Verhältnis hatte sich empirisch als günstig herausgestellt. Die Ausbeute an Phagen lag bei über 10^{11} /ml. Die Phagen-DNA war nach dem Gelbild zu urteilen vollständig mit Eco RI spaltbar (Abb. 9).

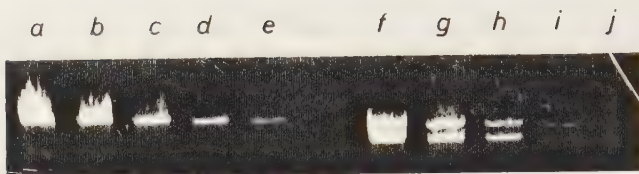


Abb. 9. Lambda gt11 Vektor-DNA ist frei von sichtbaren kontaminierenden Nukleinsäuren und mit Eco RI vollständig spaltbar.

Lambda gt11-DNA wurde wie in Material und Methoden beschrieben präpariert, mit Eco RI gespalten und mit Phosphatase behandelt. Ungespaltene und mit Eco RI gespaltene DNA wurde parallel auf ein 0,3% Agarosegel aufgetragen und 3 h bei 80 V elektrophoretisiert.

a - e: 800, 400, 200, 100 und 50 ng ungespaltene DNA
 h - j: 800, 400, 200, 100 und 50 ng mit Eco RI
 gespaltene lambda gt11-DNA

Nach Dephosphorylierung der Eco RI-Enden mit alkalischer Phosphatase wurde die lambda-DNA mit einem 0,6 kb langen Testfragment (aus dem Lysozymgen des Huhns) ligiert und der Anteil rekombinanter und nicht-rekombinanter Phagen nach in vitro Verpackung bestimmt. Die Ligierung wurde in einem möglichst kleinen Volumen durchgeführt, um die Konzentration der Vektorenden hoch zu halten und die Zyklisierung des Inserts zu unterdrücken (36). Das molare Verhältnis zwischen Vektor- und Insertenden sollte etwa bei 1 liegen. Tabelle 1 zeigt das Ergebnis einer typischen Testligierung und Verpackung.

Tabelle 1. Lambda gt11 Vektor-DNA und die Verpackungsextrakte gestatten die effiziente Klonierung von Inserts um 1 kb.

Verpackungsansatz	weiße Plaques pro ug Vektor-DNA	blaue Plaques pro ug Vektor-DNA
1 ug lambda-DNA + 10 ng Insert (0,6kb) ligiert	$1,8 \cdot 10^6$	$2,5 \cdot 10^4$
1 ug lambda-DNA ligiert	$2 \cdot 10^3$	$2 \cdot 10^4$
1 ug lambda-DNA nicht ligiert	$7 \cdot 10^2$	$6 \cdot 10^4$

Sowohl der Anteil rekombinanter Phagen als auch die Verpackungseffizienz erschienen ausreichend zum Aufbau einer repräsentativen cDNA-Genbank. Die verbleibenden nicht-rekombinanten Phagen sind sehr wahrscheinlich auf nicht vollständige Eco RI-Spaltung zurückzuführen, da ihre Zahl durch eine Ligierung nicht erhöht wird.

Verpackungsextrakte wurden hergestellt nach Scalenghe et al. (37). Kleine Varianten im Protokoll waren ohne Auswirkung auf die Qualität der Extrakte. Sehr entscheidend wirkt sich jedoch die Reinheit der Ausgangskulturen von BHB 2688 und BHB 2690 aus. Schon minimale Kontaminationen, die auf einer Agarplatte erst nach einigen Tagen sichtbar wurden, konnten die Verpackungseffizienz beeinträchtigen. Mit mehrfach gereinigten Ausgangsstämmen wurden Extrakte hergestellt, die mit lambda gt11 DNA mindestens 10^7 Plaques pro ug DNA erbrachten. Sie waren damit gleich gut oder besser als kommerziell erhältliche Extrakte.

2.3.2. Präparation von mRNA.

Die aus LNCaP-Zellen präparierte Gesamt-RNA besaß ein oD-Verhältnis A_{260}/A_{280} von über 1.8. Die beiden großen ribosomalen RNA-Spezies (28 S und 18 S RNA) zeigten nach

Elektrophorese auf Agarose-Harnstoff-Gelen (38) kein Anzeichen von Abbau (Abb. 10). Aus 10 Kulturschalen mit 15 cm Durchmesser wurden etwa 140 A₂₆₀-Einheiten Gesamt-RNA isoliert.

Die Ausbeute an polyadenylierter RNA lag im Bereich weniger Prozent der Gesamt-RNA. Nach drei Zyklen über oligo-dT war nur noch wenig ribosomale RNA in der poly-A haltigen RNA zu erkennen. Der Anteil an cDNA-Klonen, die ribosomale Sequenzen enthalten, sollte daher sehr gering bleiben.

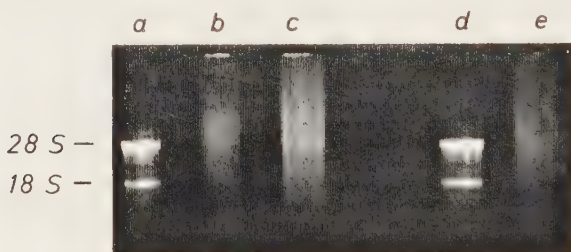


Abb. 10. Gesamt-RNA und poly A-haltige RNA zeigen keine Anzeichen von Abbau.

RNA-Proben wurden auf einem Agarose-Harnstoff-Gel wie in Material und Methoden beschrieben aufgetrennt und unter UV-Licht photographiert.

- a und d: 1 µg Gesamt-RNA
 b und c: 1 und 2 µg poly A-haltige RNA nach 3 maliger Chromatographie über eine Säule mit Oligo dT-Zellulose
 e: 1 µg poly A-haltige RNA wie in Bahn b), jedoch nach Zentrifugation durch 5,7 M CsCl

2.3.2. Synthese der cDNA und RI-Methylierung.

Es gibt 2 Möglichkeiten, die Synthese des 1. Strangs zu starten:

- a) mit Oligo-dT am 3'-Ende der mRNA oder
 b) mit kurzen Oligonukleotiden zufälliger Sequenz.

Im allgemeinen wird der Start mit Oligo-dT bevorzugt, da eine starke Selektion zugunsten der reversen Transkription von mRNA gegenüber ribosomaler RNA erreicht wird.

Oligo-dT hybridisiert praktisch nicht an rRNA. Das tatsächliche Ausmaß der Kontamination poly A-haltiger RNA mit rRNA ist anhand von Gelbildern nur annähernd abzuschätzen. Eine weitere Maßnahme zur Unterdrückung der Transkription von rRNA ist die Denaturierung der RNA vor der Synthese des 1. Strangs durch kurzzeitiges Erhitzen oder durch Zusatz von Hydroxymethyl-Quecksilber (39). Dadurch werden zufällig entstandene Primer-Template-Strukturen aufgeschmolzen und der Anteil der an poly-A : Oligo-dT gestarteten Transkripte wird deutlich erhöht.

Eukaryotische mRNA's enthalten stets eine 3'-nichttranslatierte Sequenz, die oft mehrere hundert Basen lang ist. Wird der 1. Strang am poly A-Ende gestartet, so muß zuerst der ganze 3'-nichttranslatierte Abschnitt transkribiert werden, und dann erst codierende Sequenz. Der Start am 3'-Ende bedingt eine starke Anreicherung nicht-codierender Sequenzen in der cDNA-Bank. Diesem Nachteil kann durch Größenselektion der cDNA teilweise abgeholfen werden. Mit Oligo-dT gestartete cDNA's, die kleiner sind als 0,5 kb, enthalten zum Großteil ausschließlich nicht-codierende Sequenzen und sind damit wertlos. Es ist also nur dann sinnvoll, mit Oligo-dT zu starten, wenn die Bedingungen der cDNA-Synthese so weit optimiert sind, daß der überwiegende Teil der cDNA-Moleküle größer als 800 Basenpaare wird. Nur dann ist gewährleistet, daß hinreichend lange codierende Abschnitte in der größenselektierten Genbank repräsentiert sind. Extrem kurze mRNA's, die für kleine Proteine codieren, gehen dann natürlich verloren. Die mRNA für alpha-Mikroseminoprotein ist z.B. nur wenig über 0,5 kb groß (12) und dürfte in einer größenselektierten Bank stark unterrepräsentiert sein oder völlig fehlen.

Der Start des 1. Strangs mit Zufalls-Oligonukleotiden vermeidet die Anreicherung nicht-codierender Sequenzen in der Genbank, da mit gleicher Wahrscheinlichkeit im codierenden und im nicht-codierenden Teil der mRNA ge-

startet wird. Damit wird auch die Größenselektion weniger wichtig. Auch relativ kleine cDNA-Fragmente können wertvolle Information aus dem Strukturgen enthalten. Die cDNA-Synthese muß weniger optimiert werden. Die Rekonstruktion vollständiger cDNA's aus kleineren Fragmenten kann allerdings zu einem aufwendigen Unternehmen werden. Der wesentliche Nachteil der Zufalls-Oligonukleotide besteht darin, daß sie nicht gegen die reverse Transkription von rRNA selektieren.

In dieser Arbeit wurde versucht, cDNA-Moleküle der vollen Länge zu synthetisieren und durch Start der reversen Transkription mit Oligo-dT die Entstehung ribosomaler Klone hintanzuhalten.

Viele verschiedene Prozeduren zur Synthese und Klonierung von cDNA wurden entwickelt und veröffentlicht, die sich im wesentlichen in der Art und Weise unterscheiden, wie der 2. Strang der cDNA gestartet wird. Bei der "traditionellen" S1-Methode wird der 1. Strang von der komplementären mRNA vollständig befreit, liegt also als Einzelstrang vor. Die Synthese des 2. Strangs wird gestartet, indem das 3'-Ende des 1. Strangs in Form einer Haarnadelschleife zurückklappt und der Polymerase eine Primer-Template-Struktur anbietet. Vor dem Einsetzen der cDNA in einen Vektor muß die Schleife durch eine Einzelstrang-spezifische Nuklease, z.B. S1 aus *Aspergillus oryzae*, geöffnet werden. Dadurch gehen unvermeidlich die am äußersten 5'-Ende der cDNA gelegenen Nukleotide verloren. Um diesen Nachteil zu umgehen, wurden Verfahren zur Synthese des 2. Strangs erarbeitet, die ohne S1-Behandlung auskommen. Es gibt die Möglichkeit, das 3'-Ende des 1. Strangs mit Hilfe der terminalen Transferase um einige dC-Nukleotide zu verlängern und daran einen oligo-dG Primer zu hybridisieren (40). Das Ausmaß der Reaktion der terminalen Transferase am 1. Strang der cDNA ist aber nur schlecht zu kontrollieren. Eine negative Auswirkung des G:C-Trakts auf die Transkription der ein-

gesetzten cDNA oder auf die Replikation des Phagengenoms konnte nicht ausgeschlossen werden. Eine Alternative, die keine Homopolymeren zwischen Vektor und cDNA einführt, wurde von Gubler und Hoffman (41) publiziert. Die Synthese des 2. Strangs startet an RNA-Primern, die durch RNase H Aktivität aus dem mRNA-Molekül entstehen. Die Polymerase I aus *E. coli* kann RNA als Primer verwenden und eventuell noch stromab gelegene Hybrid-RNA mit Hilfe ihrer 5'-3'-Exonukleaseaktivität abbauen (42). Als Ergebnis der Reaktion entsteht eine durchgehende doppelsträngige DNA mit einem Rest RNA am 5'-Ende des 2. Strangs. Die genaue Gestalt des 5'-Endes der mRNA nach vollendeter cDNA-Synthese ist nicht bekannt.

Zunächst wurde die cDNA nach Gubler und Hoffman (41) präpariert. Sowohl der 1. als auch der 2. Strang war von der erwarteten Länge. Es gelang auch, Eco RI-Linker an die cDNA zu ligieren. Die Insertion der cDNA in die Vektor-DNA war allerdings nur mit sehr schlechten Ausbeuten möglich. Verschiedene enzymatische Methoden, die an der cDNA vor der Ligierung mit dem Linker glatte Enden erzeugen sollten (43), brachten nicht den gewünschten Erfolg. Daher wurde auf die S1-Methode zurückgegriffen (44). Die erfolgreiche Synthese des 1. und 2. Strangs ist im Alkaligel (Abb. 11) deutlich zu erkennen.

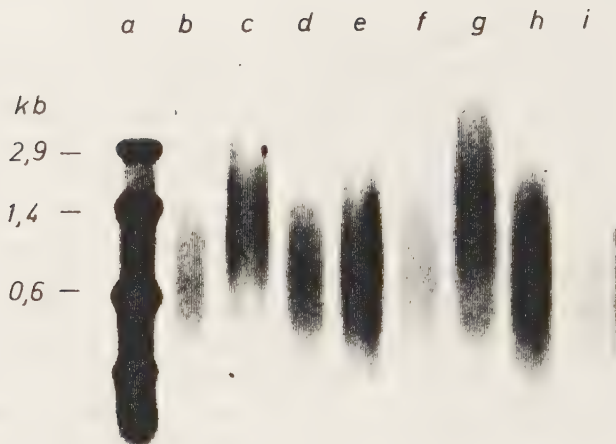


Abb. 11. 1. und 2. Strang der cDNA entsprechen der erwarteten Länge.

cDNA wurde nach T. Huynh (44) präpariert und mit S1-Nuklease behandelt. Auf einem Alkaligel wurden 1200 cpm pro Bahn aufgetragen.

- a: Marker, pBR 322 mit 0,6 kb Eco RI-Insert gespalten mit Eco RI und Ava I
 b und f: 1. Strang
 c und g: 2. Strang mit Haarnadelschleife
 d und h: 2. Strang nach 15 min S1-Behandlung
 e und i: 2. Strang nach 30 min S1-Behandlung

Alle DNA-Moleküle sind in 30 mM NaOH vollständig denaturiert und laufen als Einzelstränge. Durch Anfügen des 2. Strangs ist der 1. Strang länger geworden, theoretisch doppelt so lang. Nach Öffnung der Haarnadelschleife mit S1 wird die ursprüngliche Länge wieder erreicht. Die hohe Spezifität der S1-Nuklease für Einzelstränge führt zu einem klaren Stop des Abbaus am Beginn des Doppelstrangs. Nach 30 min Inkubation ist die Reaktion gegenüber der 15 min Inkubation nicht sichtbar fortgeschritten. Die S1-behandelte cDNA konnte sowohl mit Eco RI-Linkern ligiert als auch in lambda gtl1 kloniert werden.

2.3.4. Ligierung der cDNA mit synthetischen RI-Linkern, Größenselektion der cDNA und Klonierung in lambda gt11.

Die Verknüpfung der cDNA mit synthetischen, radioaktiv markierten Eco RI-Linkern, das Abspalten überzähliger Linker sowie die Größenselektion der cDNA auf einer Gel-filtrationsäule wurden wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt. Das Ergebnis der Größenfraktionierung ist in Abb. 12 gezeigt. Ein Aliquot aus Fraktion 25 wurde mit Eco RI gespalten, um eventuell nicht abgespaltene Linkermoleküle sichtbar zu machen. Auf der Autoradiographie waren keine solchen zu erkennen, die Abspaltung der Linker sollte also vollständig erfolgt sein.

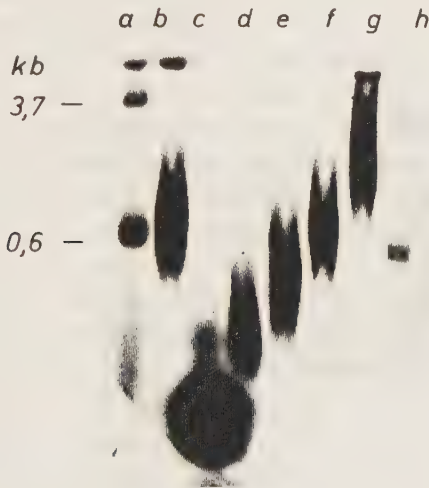


Abb. 12. Fraktionierung der cDNA mit radioaktiv markierten Linkern auf einer Biogel A-50m Säule.

a und h: Marker, pBR 322 mit 0,6 kb Eco RI-Insert gespalten mit Eco RI und Sal I
 b: Fraktion 25 der Säule, nachgespalten mit Eco RI
 c: Fraktion 40 der Säule, die fast nur noch abgespaltene radioaktive Linker enthält.
 d bis g: Fraktionen 35, 30, 24 und 18 der Säule, die größenfraktionierte cDNA enthalten.

Die gesamte Ausbeute nach Ligierung der cDNA mit Vektor-DNA und in vitro Verpackung lag bei $4 * 10^4$ rekombinanten Phagen pro μg mRNA. Zunächst wurde aus Testligierungen eine cDNA-Bank mit 30.000 rekombinanten Plaques und einem Anteil von 50 bis 70% an Rekombinanten etabliert. Da die mRNA's für PAP und PSA in hormonstimulierten LNCaP-Zellen nicht zu den seltenen Spezies gehören dürften, wurde bereits in dieser relativ kleinen Genbank mit der Selektion spezifischer Klone begonnen. Parallel dazu wurde die Genbank auf $2 * 10^5$ rekombinante Plaques erweitert.

2.3.5. Überprüfung der Länge der klonierten cDNA-Fragmente.

Eine ganz entscheidende Frage war die nach der Größe der klonierten cDNA-Fragmente. Ein weißer Plaque auf X-gal und IPTG enthaltendem Agar ist noch keine Garantie für einen echten Rekombinanten. Manchmal kommt es zur Störung des Leserasters der β -Galaktosidase, ohne daß ein Insert nachweisbar wäre. Daher wurden aus der Genbank 20 bis 50 Plaques pro Schale ausplattiert, 10 weiße Plaques abgenommen, Phagen-DNA präpariert, mit Eco RI gespalten und auf Agarosegelen aufgetrennt. Soweit erkennbar enthielten alle weißen Plaques Inserts, deren Länge von 0,5 bis über 3 kb variierte (Abb. 13).

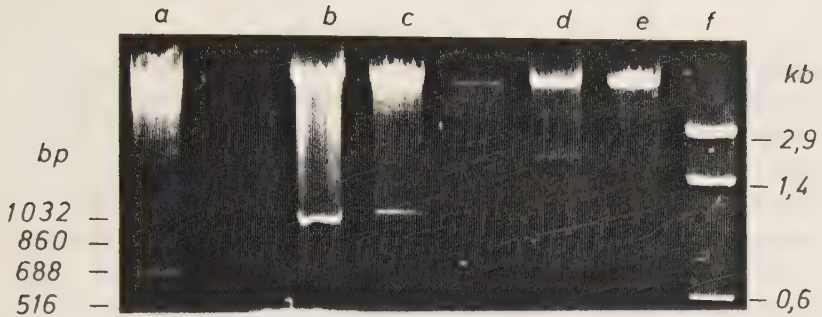


Abb. 13. Die Inserts der cDNA-Bank besitzen eine ausreichende Länge.

Weiße Plaques aus der cDNA-Bank wurden isoliert und präparativ angezogen. Die Phagen-DNA wurde mit Eco RI gespalten, um Inserts sichtbar zu machen.

a: Marker, Hind III gesplattene CV-1-DNA
b bis f: DNA aus rekombinanten Plaques. Die Insertgrößen liegen etwa bei: b) und c): 1 kb, d: 2,2 kb, e: 0,65 kb. f: Marker, pBR 322 mit 0,6 kb Eco RI-Insert gespalten mit Eco RI und Ava I

Diese Größenverteilung sollte sicherstellen, daß auch dann immunologisch positive Klone gefunden werden, wenn die 3'-nichttranslatierte Sequenz der mRNA einige hundert Basenpaare lang sein sollte.

2.4. Selektion PSA-spezifischer cDNA-Klone mittels Antikörpern.

Zum Identifizieren PSA- und PAP-spezifischer cDNA's wurden Y 1090-Zellen mit den Phagen infiziert, in Weichagar plattiert und so lange bei 42°C inkubiert, bis die ersten Plaques gerade erkennbar waren. Das dauerte 2 bis 3 Stunden. Auf einer Petrischale mit 10 cm Durchmesser können maximal 10000 Plaques Platz finden, ohne daß sich konfluente Lyse ergibt. Bei hoher Dichte wurde allerdings beobachtet, daß viele Plaques von besser wachsenden Nachbarn unterdrückt wurden. Um eine repräsentative Phagenpopulation untersuchen zu können, wurden 6 Petri-

schalen mit jeweils 5000 bis 8000 Plaques vorbereitet. Da der Anteil rekombinanter Plaques in der Genbank etwa 60% beträgt und jedes 6. cDNA-Molekül richtig im Leseraster sitzt, müssen von vorneherein 10 mal mehr Plaques untersucht werden als beim Suchen mit einer Nukleinsäureprobe in einer 100% rekombinanten Genbank nötig wäre. Der tatsächliche Anteil der PSA- und PAP-spezifischen mRNA an der gesamten mRNA ist natürlich nicht bekannt. Bei einem geschätzten Anteil von jeweils 0,1% wäre durchschnittlich unter 10000 Plaques in der vorliegenden Genbank ein immunologisch positiver zu erwarten. Die verwendeten Antisera gegen PSA und PAP waren polyklonale Seren aus Kaninchen gegen hochgereinigte menschliche Proteine. Diese Seren müßten in der Lage sein, jedes immunogene Epitop auf dem Protein zu erkennen. Es ist daher keineswegs notwendig, daß das vollständige Protein im Hybrid mit der β -Galaktosidase vorliegt. Es genügen Ausschnitte, die von der Antikörper-Population erkannt werden.

Fehlermöglichkeiten beim Suchen spezifischer cDNA's mit Antikörpern bestehen in 2 Richtungen:

- a) Das gesuchte Hybridprotein wird zwar in der Expressionsbank richtig synthetisiert, aber nicht gefunden. Die Ursache dafür ist entweder ein ungeeignetes Antiserum oder aber eine zu hohe Verdünnung des verwendeten Serums. Bei käuflichen Antisera ist eine Verdünnung von 1:200 bis 1:300 in den allermeisten Fällen möglich. Viele solcher Seren können auch noch stärker verdünnt werden. In den hier beschriebenen Experimenten wurde eine Verdünnung von 1:300 gewählt.
- b) Falsch positive Plaques geben ein Signal. Diese Möglichkeit ist gerade bei immunologischen Verfahren zur Entdeckung bestimmter Proteine sehr ernst zu nehmen. Es ist möglich, daß die Ausgangszellen zwei oder mehrere ähnliche, immunologisch kreuzreagierende Proteine synthetisieren, deren mRNA's in der Genbank repräsentiert sind. Eine solche Situation ist im Falle der PAP gege-

ben. Es wurden 2 verschiedene Proteine isoliert, die sich in der Aminosäure-Zusammensetzung und in der N-terminalen Sequenz unterscheiden, aber beide mit Antikörpern gegen PAP reagieren (14). Das PAP-ähnliche Protein wurde als Zn-alpha₂-Glykoprotein identifiziert (45). Weiter ist denkbar, daß die zur Immunisierung der Kaninchen verwendete Proteinfraction noch Fremdprotein enthielt, gegen das ebenfalls Antikörper gebildet wurden. Wenn eine unzureichende Spezifität des Antiserums vermutet wird, muß mit einem Westernblot (46) zunächst geklärt werden, ob außer dem gesuchten noch andere Proteine erkannt werden. Die in dieser Arbeit verwendeten Antisera werden verbreitet in der Diagnostik und für immunohistochemische Anfärbungen eingesetzt, so daß eine Unspezifität nicht befürchtet werden mußte.

Viele Kaninchenserum enthalten hohe Titer an Antikörpern gegen Protein aus E. coli. Das kann zu einer starken, gleichmäßigen Beladung des Filters mit Kaninchen-Immunglobulinen führen, die den mit Peroxidase gekoppelten 2. Antikörper quantitativ binden und eine gleichmäßige Anfärbung des ganzen Filters bewirken. Die spezifisch angefärbten Plaques würden sozusagen im falsch positiven Hintergrund untergehen. Als Gegenmaßnahme wurden E. coli- und lambda-Proteine an 2 Nitrozellulosefilter gebunden und 2 Stunden im verdünnten Antiserum inkubiert. Alle Antikörper gegen Wirtsproteine bleiben an diesen Filtern hängen und können entfernt werden.

Die Experimente dieser Arbeit bestätigten die Abschätzungen über die Häufigkeit der PSA-spezifischen mRNA sowie die Spezifität des Anti-PSA Serums. Unter $2 \cdot 10^4$ rekombinanten Plaques wurden zwei gefunden, die mit Antikörpern gegen PSA ein deutliches und reproduzierbares Signal zeigten. Die Hintergrundfärbung war gering. Beide Plaques wurden zunächst gereinigt. Es erwies sich als zweckmäßig, den Weichagar mit dem positiven Plaque in 0,5 ml SM-Puffer zu schütteln und von dieser Phagensus-

pension verschiedene Verdünnungen zu plattieren. Schalen mit 50 bis 100 Plaques sind zur Anreicherung besonders geeignet, da mit großer Sicherheit richtige Plaques dabei sind und der Abstand zu negativen Plaques groß genug ist, um die Kontamination im Vergleich zur Ausgangssuspension zu verringern. Die Phagen diffundieren im Weichagar erstaunlich schnell und weit. Selbst ein Abstand von 5 mm zum nächsten negativen Nachbarplaque ist noch keine Garantie für die Reinheit. Außerdem können 2 Plaques übereinanderliegen und einen einzigen Plaque vortäuschen. Wenn unter etwa 100 Tochterplaques eines isoliert gelegenen positiven Plaques kein negativer mehr zu finden war, wurde die Phagenpopulation als homogen angesehen und zur Präparation von Insert-DNA hochgezogen.

Mit Anti-PAP-Serum wurde unter $2 \cdot 10^4$ rekombinanten Plaques ein positiver gefunden, aber im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter charakterisiert. Der Nachweis, daß eine isolierte cDNA tatsächlich eine PAP-spezifische Sequenz repräsentiert, ist schwerer zu führen, da nur eine kurze N-terminale Aminosäuresequenz des PAP-Proteins veröffentlicht wurde (14). Für PSA hingegen wurde die vollständige Proteinsequenz erarbeitet (13).

2.5. Analyse einer PSA-spezifischen cDNA.

Um die Identität der PSA-spezifischen cDNA nachzuweisen, mußte die Nukleotidsequenz des codierenden Abschnitts bestimmt und mit der veröffentlichten Aminosäuresequenz (13) zur Deckung gebracht werden. Als Sequenzierstrategie wurde die Didesoxy-Methode nach Sanger (47) im Vektor M13 mp10 bzw. M13 mp11 (48) gewählt.

Zunächst wurde aus einer 500 ml Anzucht des gereinigten Plaques Phagen-DNA präpariert und mit Eco RI analytisch

und präparativ gespalten. Die cDNA besaß eine Länge von etwa 0,9 kb (Abb. 14) und wurde in die Eco RI-Stelle des Phagen M13 mp10 und M13 mp11 subkloniert.

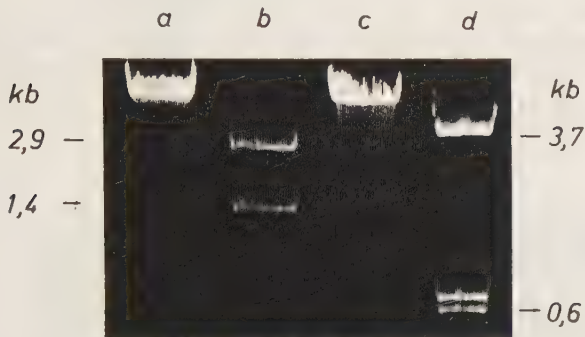


Abb. 14. Das Insert des mit Antikörpern gegen PSA reagierenden Plaques ist 0,9 kb lang.

a: ungespaltene lambda-DNA

b: Marker, pBR 322 gespalten mit Eco RI und Ava I

c: DNA des PSA-positiven Plaques, gespalten mit Eco RI

d: Marker: pBR 322 mit 0,6 kb Eco RI-Insert gespalten mit Eco RI und Sal I

2.5.1. Sequenzierung des codierenden Abschnitts der cDNA.

6 Klone in M13 mp10 und 6 Klone in M13 mp11 wurden isoliert und die Einzelstrang-DNA von 7 Klonen ansequenziert. Es zeigte sich, daß das cDNA-Insert in Klon 4 mit dem poly A-Ende zunächst dem Sequenz-Primer eingebaut war, in Klon 1 in der umgekehrten Orientierung. Der in Klon 4 gefundene poly A-Trakt umfaßt etwa 150 Basenpaare. Es mußte überprüft werden, ob die aus Klon 4 gelesene Sequenz (Abb. 15 und 18) PSA-spezifisch ist. Ein Vergleich der lesbaren Sequenz mit der publizierten Aminosäuresequenz zeigte eine fast vollständige Übereinstimmung (vgl. Abb. 18). Vom codierenden Bereich sollten daher Strang und Gegenstrang sequenziert werden.

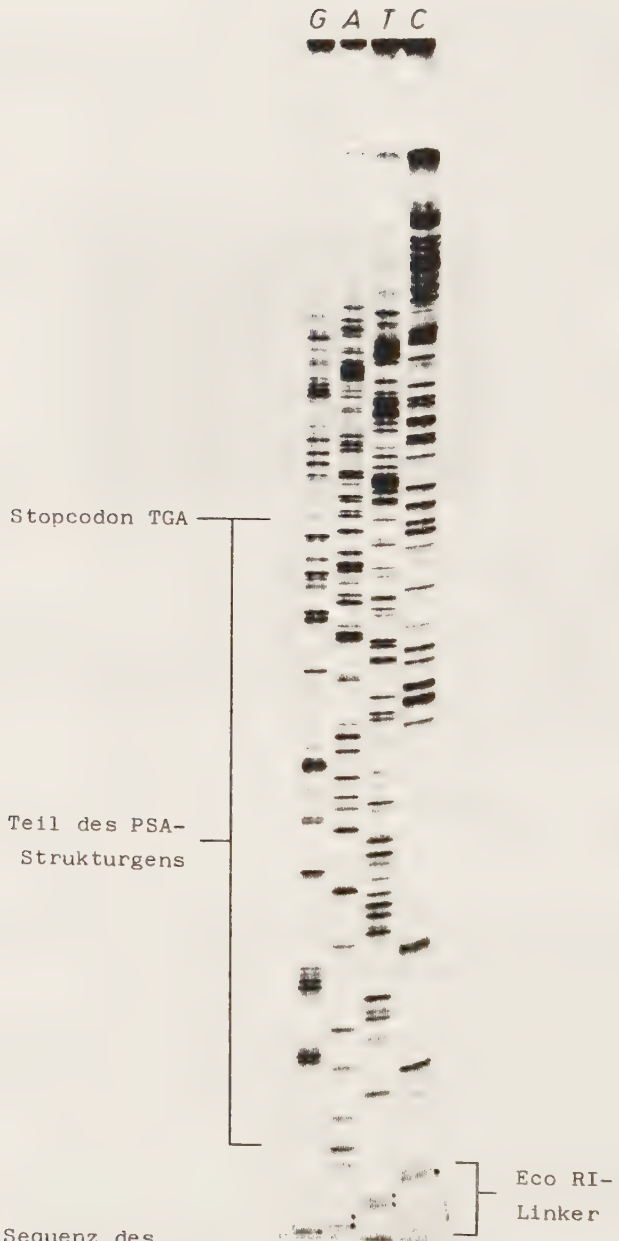


Abb. 15. Sequenz des codierenden Abschnitts der PSA-spezifischen cDNA.

2.5.2. Vergleich der aus der Nukleotidsequenz des cDNA-Klons abgeleiteten Aminosäuresequenz mit der veröffentlichten Proteinsequenz.

Da das cDNA-Fragment mit 0,9 kb zu lang ist, um an einem Stück sequenziert zu werden, wurde nach einer Restriktionsnuklease gesucht, die es ungefähr in 2 Hälften teilt. Bam HI erwies sich als bestens geeignet (Abb. 16).

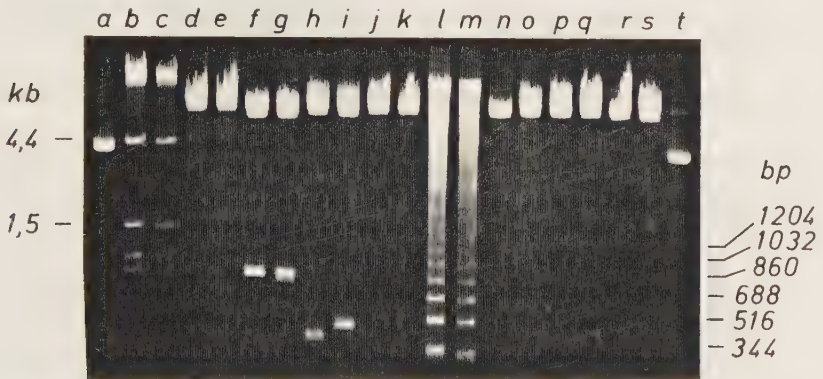


Abb. 16. Restriktionsanalyse der PSA-spezifischen cDNA im Vektor M13 mp10 (Klon 4 und Klon 1). Von den getesteten Restriktionsnukleasen mit einer Erkennungssequenz von 6 Basen spaltet nur Bam HI im cDNA-Fragment.

a: Klon 4 ungespalten

b und c: lambda gtl1 gespalten mit Sac I, Kpn I und Eco RI

l und m: CV-1 DNA gespalten mit Hind III

Klon 4 und 1 gespalten mit:

d und e: Sac I n und o: Acc I

f und g: Eco RI p und q: Pst I

h und i: Bam HI r und s: Hind III

j und k: Xba I t: Klon 1 ungespalten

In Klon 1 und 4 ist das Insert in verschiedener Orientierung eingebaut. Aus beiden Plasmiden wurden mit Bam HI komplementäre Fragmente herausgespalten, die Plasmide wurden religiert und zum Sequenzieren der Gegenstränge verwendet (Abb. 17).

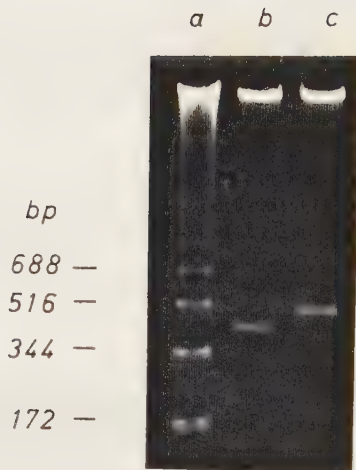


Abb. 17. Die PSA-spezifische cDNA ist in 2 Bam HI-Fragmente zerlegbar.

a: CV-1-DNA gespalten mit Hind III

b: Klon 4 gespalten mit Bam HI. Das herausgespaltene Fragment enthält die flußab (3') gelegene Hälfte der nichttranslatierten Sequenz und das poly A-Ende. Der stromauf gelegene Teil der nichttranslatierten Sequenz und ein Teil des Strukturgens sind noch mit dem Vektor verknüpft.

c: Klon 1 gespalten mit Bam HI. Das herausgespaltene Fragment enthält den stromauf (5') gelegenen Teil der nichttranslatierten Sequenz und einen Teil des Strukturgens. Dieses Fragment wurde aus dem Gel isoliert und zur Herstellung der Hybridisierungsprobe für die Identifizierung weiterer PSA-spezifischer Klone verwendet (Abschnitt 2.6.).

Die Sequenzierung ergab, daß lediglich am 5'-Ende der cDNA im Anschluß an den Eco RI-Linker eine Folge von 5 Basenpaaren liegt, die nicht in das Strukturgen paßt. Die 55 C-terminalen Aminosäuren (Position 186 bis 240) der veröffentlichten Proteinsequenz (13) stimmen vollständig mit der aus der Nukleotidsequenz ableitbaren Aminosäuresequenz überein (Abb. 18).

Damit ist die Identität des gefundenen cDNA-Fragments mit einer PSA-spezifischen Sequenz bewiesen.

1	<u>GAATTC</u> CCCAAGCACCTGCTCGGGTGATTCTGGGGGCCACTTGTCTGTAATGGTGTG SerThrCysSerGlyAspSerGlyGlyProLeuValCysAsnGlyVal	60
61	CTTCAAGGTATCACGTCATGGGGCAGTGAACCATGTGCCCTGCCCGAAAGGCCTTCCCTG LeuGlnGlyIleThrSerTrpGlySerGluProCysAlaLeuProGluArgProSerLeu	120
121	TACACCAAGGTGGTGCATTACCGGAAGTGATCAAGGACACCATCGTGGCCAACCCCTGA TyrThrLysValValHisTyrArgLysTrpIleLysAspThrIleValAlaAsnProEnd	180
181	GCACCCCTATCAACTCCCTATTGTAGTAAACTTGGAACCTTGGAAATGACCAGGCCAAGA	240
241	CTCAGGCCTCCCCAGTTCTACTGACCTTTGTCTTAGGTGTGAGGTCCAGGGTTGCTAGG	300
301	AAAAGAAATCAGCAGACACAGGTGTAGACCAGAGTGTTTCTTAAATGGTGTAATTTTGTCT	360
361	CTCTCTGTGTCTCTGGGGAATACTGGCCATGCCTGGAGACATATCACTCAATTTCTCTGAG	420
421	GACACAGATAGGATGGGGTGTCTGTGTTATTTGTGGGGTACAGAGATGAAAGAGGGGTGG	480
481	<u>GATCC</u> CACACTGAGAGAGTGGAGACTGACATGTCTGGA 518	

Abb. 18. Vergleich der gelesenen Nukleotidsequenz mit der publizierten Aminosäuresequenz.

Die Sequenz des Eco RI-Linkers (1-7) und die Bam HI-Spaltstelle (480-485) sind unterstrichen. Die Übereinstimmung mit der publizierten Aminosäuresequenz erstreckt sich von Serin-186 bis Prolin-240.

2.5.3. Karte des PSA-spezifischen cDNA-Klons.

Die gefundene PSA-spezifische cDNA enthält einen etwa 0,15 kb langen poly A-Trakt, eine etwa 0,58 kb lange 3'-nichttranslatierte Sequenz, das Stopcodon TGA und 55 von 240 Aminosäurecodons des Strukturgens (Abb. 19).

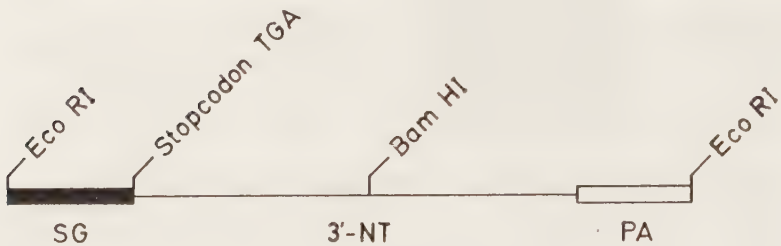


Abb. 19. Karte der PSA-spezifischen cDNA.

SG: Strukturgen, 55 von 240 Codons

3'-NT: 3'-nichttranslatierte Sequenz, etwa 0,58 kb

PA: poly A-Trakt der mRNA, etwa 0,15 kb

2.6. Isolierung weiterer 11 PSA-spezifischer Klone mit Hilfe einer Nukleinsäure-Probe.

Um eine möglichst vollständige PSA-cDNA zu erhalten, wurde die Genbank mit einer PSA-spezifischen Nukleinsäureprobe abgesucht. In 12 Schalen wurden je 3000 Plaques (entsprechend etwa 1500 Rekombinanten pro Schale) der Genbank ausgesät. Die Phagen-DNA wurde an Nylonfilter gebunden und mit einer radioaktiv markierten cDNA-Probe (siehe Abb. 17) hybridisiert. 14 Plaques zeigten zunächst ein Signal. In den weiteren Anreicherungs-schritten hybridisierten 11 Plaques reproduzierbar mit der PSA-spezifischen Probe. Diese weiteren Klone konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr charakterisiert werden. Nach den Hybridisierungsdaten ergab sich eine Abschätzung des Anteils PSA-spezifischer mRNA von mindestens 1 : 2000 an der gesamten mRNA.

3. DISKUSSION

3.1. Ist die LNCaP-Zelllinie geeignet als in vitro Modell eines Prostatakarzinoms?

Der Wunsch vieler Forscher, die sich mit Prostatakrebs befassen, wäre eine Zelllinie aus einem menschlichen Prostatakarzinom, die nur in Gegenwart von Androgenen wächst. Diese Forderung wird von PC-82 erfüllt, die aber bislang nur als in nackten Mäusen transplantierbares Tumorgewebe vorliegt und nicht an Zellkulturbedingungen angepaßt werden konnte (49). Vom Shionogi-Tumor, einem Mammakarzinom der Maus, existiert eine in Kultur gehaltene Zelllinie (S 115), die von Androgenen im Wachstum stimuliert wird, falls die Zellen in Suspension oder in Weichagar kultiviert werden (50). Die bisher beschriebenen anderen menschlichen Prostata-Zelllinien sind nicht androgenabhängig. Es hat nicht an Versuchen gefehlt, bei diesen Linien eine Wachstumsförderung durch Androgene nachzuweisen. Werden LNCaP-Zellen in einem Medium gehalten, das 10% Aktivkohle-behandeltes und damit steroid-freies fötales Kälberserum enthält, so stimuliert DHT die Proliferation (16). Außer Steroiden bleiben an der Aktivkohle mit großer Wahrscheinlichkeit eine ganze Reihe physiologisch wichtiger Substanzen hängen. Es darf bezweifelt werden, daß die in derart vorbehandeltem Medium beobachtete Wachstumsstimulation durch Androgene tatsächlich die in vivo so frappante Androgenabhängigkeit des Prostatagewebes widerspiegelt. Der Androgengehalt von 10% fötalem Kälberserum liegt in der Größenordnung von 20 pg/ml (51) und damit niedriger als der Plasmaspiegel bei Patienten unter androgensuppressiver Hormontherapie, bei denen 20 bis 100 pg/ml Testosteron im Plasma gemessen wurden (19). Bei so geringen Androgenkonzentrationen beginnt der klassische androgenabhängige Tumor bereits zu schrumpfen, LNCaP-Zellen dagegen wachsen noch in 2% fötalem Kälberserum, also mit 2 pg/ml An-

drogen. LNCaP kann somit nicht als Modell einer steroid-abhängigen Zelllinie analog etwa zu MCF-7, einer östro-genabhängigen Linie aus einem menschlichen Brustkrebs (52), gelten.

Ein wesentliches Ergebnis dieser Arbeit war, daß in nativem Serum das synthetische Androgen R1881 die Prolifera-tion von LNCaP-Zellen deutlich hemmt. Dieser Befund wurde durch Experimente mit anderen synthetischen Andro-genen bestätigt (28 und F. Fittler, Manuskript in Vorbe-reitung). Das ist das genaue Gegenteil dessen, was man von einer androgenabhängigen Linie erwarten sollte und steht im Widerspruch zu einer Unzahl klinischer Beob-achtungen, nach denen Prostatakarcinome durch Androgen-entzug gelindert werden. Das Karzinom, aus dem die LNCaP-Zelllinie hervorging, reagierte allerdings nicht auf Androgenentzug und kaum auf Cytostatika (16). Stellt diese Linie also einen exotischen Sonderfall dar, aus dem man für das Verständnis von Prostatakrebs nicht viel profitieren kann?

Studiert man vor allem die ältere Literatur zu Therapie-versuchen an Prostata-tumoren, stößt man auf erstaunliche Krankengeschichten bei Patienten, die mit Testosteron behandelt wurden, vor allem um eine bessere Aufnahme von $\text{Na}_3^{32}\text{PO}_4$ ins metastasenbefallene Knochengewebe zu errei-chen. So wird von Corwin und Kollegen vermerkt, daß ein-ige ihrer Patienten von deutlicher Schmerzlinderung wäh-rend ihrer Testosteron-Behandlung berichteten (53). Pearson (54) erwähnt zwei Patienten, deren Zustand sich unter Testosteron wesentlich besserte. In einer Studie an sechs ausgewählten Patienten fanden Brendler und Kol-legen viermal positive, einmal negative und einmal gar keine Effekte einer Testosteron-Behandlung (55). Prout und Brewer (56) haben die bisher wohl umfangreichste Un-tersuchung zur Androgenwirkung beim Prostatakarcinom vorgelegt. Sie umfaßt 26 Patienten. Die Autoren kommen zu dem Schluß, daß die Testosteronwirkung unvorhersehbar

positiv oder negativ sein kann, und daß oral gegebenes DES nicht signifikant besser wirkte als Testosteron. Bei einem Patienten wird die Besserung auf Testosterongabe als "dramatisch" beschrieben. Wenn auch der zahlenmäßig geringe Umfang dieser Beobachtungen statistisch abgesicherte Aussagen nicht zuläßt, so wird doch deutlich, daß es neben den androgenabhängigen Prostatakarzinomen einen bestimmten Anteil solcher gibt, deren Proliferation durch Androgene gebremst wird. LNCaP könnte ein in vitro Modell für diese Klasse von Tumoren darstellen.

3.2. Könnten synthetische Androgene zur Therapie "androgenunabhängiger" Prostatakarzinome eingesetzt werden?

Bei aller Vorsicht ermutigen die Berichte über positive Testosteronwirkungen bei Prostatakarzinom-Patienten zusammen mit den in vitro Ergebnissen mit LNCaP-Zellen zu einer Spekulation über eine eventuelle Anwendung synthetischer Androgene zur Linderung der tumorbedingten Leiden. Bei den mit Testosteron behandelten Patienten, deren Zahl allerdings gering ist, wird von schwerwiegenden Nebenwirkungen nicht berichtet. Hingegen stellen kardiovaskuläre Komplikationen bei der Östrogentherapie ein beachtliches Risiko dar (29, 57). Aus ganz anderen Quellen weiß man über die Nebenwirkungen anabol-androgener Steroide recht gut Bescheid. Viele Athleten der verschiedensten Disziplinen nahmen C¹⁷-alkylierte Testosteron-Derivate zu sich, um den Muskelzuwachs zu fördern. Das in dieser Arbeit verwendete R1881, das von G. Schneider (28) verwendete Miboleron sowie von F. Fittler eingesetzte, an verschiedenen Positionen methylierte Testosteron-Abkömmlinge (Manuskript in Vorbereitung) tragen alle eine Methylgruppe an C¹⁷ des Steroidgerüsts und wirken in sehr niedrigen Konzentrationen hemmend auf die Proliferation von LNCaP-Zellen. An Nebenwirkungen anaboler Präparate traten Schädigungen des Magen-Darm-

Traktes, der Leber und der Niere, Wasserrückhaltung und erhöhte Reizbarkeit auf (58). Sehr wahrscheinlich sind viele dieser Erscheinungen auf unkontrollierte Überdosierung über einen längeren Zeitraum zurückzuführen. In kontrollierten Versuchsreihen wurden Hormoneffekte (z.B. verminderte Testosteronsynthese im Hoden) ab Dosen von 2 - 3 mg/Tag festgestellt. Die Risiken C¹⁷-alkylierter Androgene scheinen jedenfalls nicht bedrohlicher zu sein als die der synthetischen Östrogene.

Die entscheidende Frage ist natürlich die nach dem Unterscheidungskriterium, ob ein androgenabhängiger oder ein androgenempfindlicher Tumor vorliegt. Von Parsons und Kollegen (59) wird berichtet, daß alle zehn von ihnen mit Testosteron behandelten Patienten über eine Zunahme der Schmerzen klagten und ihr Zustand sich insgesamt verschlechterte, so daß der Versuch sofort abgebrochen werden mußte. Bisher wurde stets versucht, einen Zusammenhang zwischen dem Gehalt des Tumorgewebes an Androgenrezeptoren und seiner Androgenabhängigkeit herzustellen (60). Darbre und King (61) haben gezeigt, daß die S 115-Zelllinie (Shionogi-Tumor) trotz Beibehaltung funktioneller Androgenrezeptoren in einen Zustand übergehen kann, in dem die Proliferation der Zellen von Androgenen nicht mehr beeinflußt wird. Damit ist der Gehalt an Rezeptoren als prognostisches Kriterium sehr fragwürdig geworden. Bei Prostatakarzinomen würde nur die völlige Abwesenheit von Androgenrezeptoren eine klare Entscheidungshilfe liefern, nämlich für den Verzicht auf Hormontherapie. Wenn der Tumor Rezeptoren besitzt, kann er immer noch androgenabhängig, androgenempfindlich oder auch androgenindifferent sein. Zur Klärung dieser Frage bietet der monoklonale Antikörper Ki-67 möglicherweise eine Handhabe. Er ist gegen ein Kernantigen gerichtet, das in allen Phasen des Zellzyklus außer in G₀ exprimiert wird (62). Damit läßt sich der Anteil der Zellen bestimmen, die in der Zellteilung oder einem Vorstadium dazu begriffen sind. Anhand der Expression zell-

zyklusspezifischer Antigene in Kurzzeitkulturen aus Biopsien könnte unterschieden werden, ob ein Tumor auf Androgengaben mit erhöhter oder verminderter Proliferation reagiert. Am transplantierbaren Tumorgewebe PC-82 ist der Anteil proliferierender Zellen bereits mittels Ki-67 Antikörpern bestimmt worden (63, 64).

3.3. Ist die LNCaP-Zelllinie geeignet als Modell für androgenstimulierbare Genexpression?

In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß natürliche und synthetische Androgene die PAP-Synthese in LNCaP-Zellen stimulieren. Ein auffälliger Unterschied zwischen beiden ist die andersartige Dosis-Wirkungs-Beziehung. Während das synthetische Androgen R1881 bereits bei 10 ng/ml die maximale Stimulierung bewirkt, die auch durch eine 100 fache R1881-Konzentration nicht mehr zu steigern ist, ergibt sich für Testosteron und DHT ein dosisabhängiger Anstieg des Effekts im Bereich zwischen 10 und 1000 ng/ml. Erst bei 1000 ng/ml natürlichen Androgens wird der Effekt von 10 ng/ml R1881 annähernd erreicht.

Vor allem folgende 3 Gründe sind für die hohe Wirksamkeit von R1881 vorstellbar:

a) die höhere Affinität zum Androgenrezeptor.

Die Affinität von R1881 zum Androgenrezeptor aus Rattenprostata ist etwa doppelt so hoch wie die von DHT (27).

b) die metabolische Stabilität in der Zielzelle.

R1881 wird im Cytosol aus Rattenprostata praktisch nicht metabolisiert, während DHT bereits nach 2 Stunden zu 60% in andere Steroide überführt ist (65). Nach Hasenson und Mitarbeitern (66) wird Testosteron in LNCaP-Zellen auch nicht metabolisiert. Daher ist fraglich, ob der Androgenstoffwechsel der Zellen wirklich für die unterschiedliche Reaktion auf R1881 bzw. Testosteron verantwortlich sein kann.

c) schwächere Bindung an Serumproteine.

R1881 bindet praktisch nicht an menschliche Serumproteine, während DHT eine hohe Affinität ($K_d = 0,5 \text{ nM}$) zum steroidbindenden Protein besitzt (27).

R1881 scheint für die Untersuchung der Androgenregulation *in vitro* besser geeignet zu sein als natürliche Androgene, da es in niedrigeren Konzentrationen eingesetzt werden kann und deutlichere Effekte zeigt.

Aus den dargestellten Ergebnissen kann geschlossen werden, daß die LNCaP-Zelllinie als Modell für androgeninduzierbare Genexpression durchaus geeignet ist. Im Gegensatz dazu stuften Hasenson und Mitarbeiter diese Linie als androgen-resistent ein (66). Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß die Linie im Laufe der Zeit hormon-insensitive Sublinien ausbildet.

Ein überraschendes Ergebnis war die leichte Stimulierung der PAP-Synthese in LNCaP-Zellen durch $1 \mu\text{g/ml}$ Östradiol. Eine mögliche Erklärung wäre eine unspezifische Bindung von Östradiol an den Androgenrezeptor oder eine durch den Östradiolrezeptor vermittelte Stimulierung. LNCaP-Zellen besitzen nach Horoszewicz und Mitarbeitern (17) 40 bis 70 fmol/mg Protein Östradiolbindungsstellen.

3.4. Ist die Androgenstimulierung der PAP-Synthese in LNCaP-Zellen ein Artefakt der Zellkultur oder ein Abbild der Genregulation *in vivo*?

Beobachtungen an Prostatakarzinom-Patienten, die mit Testosteron behandelt wurden, ergaben kein einheitliches Bild (55, 56). Die PAP-Aktivität im Serum wurde durch Testosterongaben höchstens um den Faktor 4 erhöht, in einigen Fällen blieb sie völlig unverändert. Die vorausgegangene Behandlung der Patienten (Orchiektomie, Östrogen oder keine) spielte für die PAP-Induktion durch Testosteron keine Rolle. Ebenso uneinheitlich reagierten

nach Hudson (15) aus malignem Prostatagewebe kultivierte Epithelzellen auf Hormongaben. Die meisten Prostatakarzinomzellen steigerten die PAP-Produktion unter Testosteron oder DHT, einige Zellproben reagierten jedoch nicht. Der vielleicht interessanteste Aspekt ist, daß Zellen aus gutartig hypertrophiertem Prostatagewebe in keinem von 180 Fällen zu erhöhter PAP-Synthese stimuliert werden konnten. Auch in der androgenabhängigen Gewebekultur PC-82 aus einem Prostatakarzinom kann die PAP-Synthese durch Androgene nicht stimuliert werden (67). Wie sind diese Diskrepanzen zu erklären? Mangel an Androgenrezeptoren sollte nicht dafür verantwortlich sein, da in PC-82-Zellen Rezeptoren nachgewiesen wurden (68, 69), und man wohl davon ausgehen darf, daß von 180 untersuchten gutartigen Hyperplasien nicht alle den Androgenrezeptor verloren haben.

Sehr aufschlußreiche Experimente von Cunha und Mitarbeitern mahnen zur Vorsicht bei der Interpretation von Androgeneffekten in vivo (70). Es wurde gezeigt, daß Mesenchymzellen (= Stromazellen) aus Rattenprostata in der Lage sind, bei Epithelzellen aus Tfm-Mäusen (Tfm = testikuläre Feminisierung), die keinen Androgenrezeptor exprimieren können (71), eine normale, androgenabhängige Differenzierung auszulösen. Die Androgenwirkung auf das Tfm-Epithel muß durch Faktoren unbekannter Natur ausgeübt werden, welche ihrerseits androgenabhängig von den Stromazellen synthetisiert werden. Vor diesem Hintergrund ist denkbar, daß eine wirklich androgenabhängige Zelllinie aus einem Prostataepithel in Reinkultur, also ohne Stroma, nicht lebensfähig ist. Die PC-82 Tumoren sind in der nackten Maus von 5% Maus-"Stroma"-Zellen durchsetzt (72) und können nicht an Zellkulturbedingungen angepaßt werden. Gegen PC-82 wurde ein monoklonaler Antikörper erzeugt, der mit Stromazellen aus Prostata, nicht jedoch mit Epithelzellen reagiert (73). Das ist ein starker Hinweis darauf, daß PC-82 einen Verband aus Epithel- und Stromazellen darstellt.

Die direkte Steroidregulation der PAP-Synthese, wie sie in dieser Arbeit an LNCaP-Zellen gezeigt wurde, könnte in vivo durch eine übergeordnete Regulation, die von Stromazellen ausgeht, modifiziert oder völlig außer Kraft gesetzt werden. Wenn bei Patienten eine androgenbedingte Erhöhung des PAP-Spiegels beobachtet wurde, lag sie stets in derselben Größenordnung wie die bei LNCaP-Zellen gefundene Induktion der PAP-Synthese.

3.5. Wie sehen auf Androgene ansprechende Regulationssequenzen aus?

Auf Androgene ansprechende Regulationssequenzen in der 5'-Flanke androgenabhängig exprimierter Gene konnten bisher nicht gut definiert werden. Die 5'-flankierenden Sequenzen von sieben androgenregulierten Genen wurden auf Homologien untereinander abgesucht (74). Die sieben Gene gehören zu drei entwicklungsgeschichtlich verschiedenen Gruppen. Zum einen das S- und F-Gen, die in der Samenblase der Ratte exprimiert werden und einander sehr ähnlich sind, zum anderen die Gene für die Peptide C1, C2 und C3 des steroidbindenden Proteins der Rattenprostate und schließlich zwei Renin-Gene der Maus. Ein zwischen allen sieben Genen stark homologer Bereich wurde nur um die TATA-Box gefunden. Andere Sequenzmotive waren zwar einem Teil der verglichenen 5'-Fanken gemeinsam, kamen aber aus anderen Gründen nicht als auf Androgene ansprechende Elemente in Frage. Aus diesem Ergebnis wurde geschlossen, daß einfache Sequenzvergleiche nicht ausreichen, um solche Elemente zu entdecken.

Funktionelle Tests wurden vorgeschlagen und auch durchgeführt. Bei anderen Klassen von Steroidhormonen führte das Einbringen vermuteter Regulationssequenzen vor einem Indikatorgen in eine Zelllinie, die den entsprechenden Rezeptor exprimiert und anschließender Test auf Hormon-induzierbarkeit des Indikatorgens zur Eingrenzung der

für die Induzierbarkeit verantwortlichen Elemente. Ein Anfang in dieser Richtung wurde gemacht durch Transfektion des C3-Gens in die auf Androgene ansprechende Zellinie S 115 (Shionogi-Tumor) (75). Wurden nur wenige C3-Kopien in eine Empfängerzelle eingebracht, so blieb die Androgeninduzierbarkeit erhalten. Dieses experimentelle System sollte geeignet sein, mit Hilfe von in vitro-Mutagenese und Deletionen die auf Androgene ansprechenden Elemente festzulegen. Bislange wurde eine solche Arbeit jedoch nicht veröffentlicht.

Eine dritte Strategie nutzt die spezifische Bindung von Regulationselementen an hochgereinigtes Rezeptorprotein. Die vor abbauenden Agenzien geschützte DNA-Sequenz kann auf Gelen analysiert und sehr genau eingegrenzt werden (5). Die Anwendung einer ähnlichen Methode auf den Androgenrezeptor und seine DNA-Bindungsstelle durch Mulder et al. (76) blieb zunächst ohne Erfolg, da die verwendete Präparation von Androgenrezeptor wahrscheinlich nicht mehr an DNA band. Eine schonendere Reinigung des Androgenrezeptors erbrachte eine an Kalbsthymus-DNA bindende Rezeptorfraction (11). Dieses Material wurde für Kompetitionsexperimente eingesetzt. Die 5'-Flanke des C3-Gens von -220 bis +80 und ein Fragment aus dem ersten Intron des C3-Gens verdrängte den Androgenrezeptor am effizientesten von der Kalbsthymus-DNA. Eine weitergehende Reinigung des Rezeptors aus der DNA-bindenden Fraction führte zu Problemen im Kompetitionstest. Die Bindung an DNA war nicht mehr zu sättigen. Es konnten auch keine footprints mit dem hochgereinigten Rezeptor dargestellt werden.

Das in dieser Arbeit charakterisierte System erlaubt einen funktionellen Zugang zu den auf Androgene ansprechenden Elementen. Der vermutlich für die Androgenregulation verantwortliche Bereich in der 5'-Flanke des PSA-Gens wird in einem Plasmid vor ein leicht zu testendes Reporter-Gen (z.B. Chloramphenicol-Acetyl-Transferase-

se oder β -Galaktosidase) eingebaut. Nach Transfektion des Konstrukts in LNCaP-Zellen muß ein Test auf vorübergehende Expression mit und ohne Androgen im Medium zeigen, ob die gesuchten Elemente tatsächlich auf das Reporter-Gen wirken und seine Expression androgenregulierbar machen. Deletionen in der 5'-Flanke und weitere Tests in LNCaP-Zellen sollten die Eingrenzung der funktionell wichtigen Elemente erlauben.

Für die Feinkartierung kann eine mit anderen Steroidrezeptoren bereits erprobte Methode angewandt werden, nämlich die Lokalisierung hormonabhängiger DNase I hypersensitiver Stellen (HS) im Chromatin der 5'-Flanke des PSA-Gens. Hormonabhängige HS sind bereits mehrfach gefunden worden (8, 9, 10, 77). In mindestens zwei Fällen wurde gezeigt, daß eine nur nach Glukokortikoidgabe auftretende HS eine Bindungsstelle des Glukokortikoidrezeptors darstellt (10, 77). Letztere liegt beim Gen für die Tyrosin-Amino-Transferase der Ratte 2,5 kb stromauf (9) und beim Uteroglobingen des Kaninchens fast 2,7 kb stromauf (78), eine beachtliche Entfernung. Es ist gut möglich, daß man bei den androgenregulierten Genen bisher noch zu nahe am Promotor gesucht hat. Der Ansatz, über die Lokalisierung von HS im Chromatin nach funktionell wichtigen Abschnitten zu suchen, hat den Vorteil, daß die in vivo Situation nur wenig gestört wird und daß mit geeigneten Proben große Bereiche vor interessierenden Genen abgesucht werden können. Ein gutes Beispiel für die Auflösungsschärfe der indirekten Endmarkierung ist die Entdeckung der Östradiol-abhängigen HS 1,9 kb stromauf des Lysozym-Gens im Hühnererleiter (10), über deren Funktion jedoch noch nichts veröffentlicht wurde (Rezeptorbindung?).

3.6. Worauf beruht der therapeutische Effekt hochdosierter DESDP-Infusionen beim fortgeschrittenen Prostatakarzinom?

Die klassische androgen-supprimierende Therapie des Prostatakarzinoms mit Östrogenen (79) beruht auf der Senkung der Ausschüttung von luteinisierendem Hormon und follikelstimulierendem Hormon aus der Hypophyse. Die Testosteron-Produktion im Hoden sinkt daraufhin praktisch auf Null ("chemische Kastration"). Für diesen Effekt genügen 3 bis 5 mg DES täglich. Der Plasmaspiegel an DES liegt dann im Bereich von 2 bis 4 ng/ml (30). Bereits so niedrige DES-Spiegel bergen ein definiertes Risiko kardiovaskulärer Komplikationen, welches eine klare Abhängigkeit von der verabreichten DES-Menge zeigt (29, 57). Ein androgenabhängiger Prostata-Tumor kann durch täglich 3 mg DES für Monate bis Jahre unter Kontrolle gehalten werden. Doch kommt es zu Rückfällen, die eine cytotoxische Therapie erfordern. Die Infusion von 1 g oder mehr DESDP führt zu 500 bis 1000 mal höheren DES-Spiegeln als die orale Gabe. Nach mehreren Infusionen tritt häufig eine deutliche Besserung des Krankheitsbildes ein. Die Metastasen-Schmerzen gehen zurück, der Ausgangstumor wird kleiner und der Gehalt an Saurer Phosphatase im Serum sinkt ab. Im Hinblick auf die Nebenwirkungen der Östrogentherapie erschien es angebracht, den Wirkungsmechanismus von DES auf zellulärer Ebene genauer zu untersuchen, um eventuell zu einem besseren Verständnis der hormonellen und cytotoxischen Phänomene zu gelangen.

Niedrige DES-Konzentrationen, wie sie während der rein androgen-supprimierenden Behandlung im Plasma auftreten, hatten keinen Einfluß auf die Proliferation und die Morphologie von LNCaP-Zellen. Bis 100 ng/ml, also dem 25 bis 50-fachen der gemessenen in vivo Konzentration, war

kein Effekt zu beobachten. Niedrig dosiertes DES scheint also ausschließlich über die Senkung des Androgenspiegels zu wirken.

500 bis 1000 mal höhere DES-Spiegel, die als Spitzenwerte während DESDP-Infusionen festgestellt wurden, wirkten deutlich cytotoxisch auf Prostatakarzinomzellen. Damit konnte das grundlegende Postulat der DESDP-Therapie bestätigt werden.

Eine akzeptable Tumorthherapie sollte allerdings spezifisch auf Tumorzellen wirken und normale Zellen so wenig wie möglich schädigen. Zur Untersuchung der Zelltypspezifität des cytotoxischen Effekts von DES und seinen phosphorylierten Derivaten wurden 3 Zelllinien aus Prostatakarzinomen, 2 nicht aus Prostata stammende Tumorzelllinien (EJ aus einem Blasenkarzinom und KB aus einem Epidermiskarzinom) und eine nicht transformierte Linie aus embryonalen Lungenfibroblasten in ihrer Empfindlichkeit gegen DES, DESMP und DESDP miteinander verglichen. Es stellte sich heraus, daß diese Substanzen auf alle Tumorzelllinien cytotoxisch wirkten, unabhängig vom Ursprungsgewebe. Eine gewebsspezifische Cytotoxizität von DESDP soll durch die vorzugsweise Freisetzung von DES aus der ungiftigen "Transportform" DESDP an phosphataseproduzierenden Zellen erreicht werden. Unter den hier vorliegenden experimentellen Bedingungen waren PAP-synthetisierende LNCaP-Zellen nicht signifikant empfindlicher gegen DESMP und DESDP als phosphatase-negative Zellen. Das im Medium vorhandene fötale Kälberserum enthält meßbare Phosphataseaktivität, die vermutlich ausreicht, um innerhalb eines Tages etwa 75% der Phosphatester von 20 µg/ml DESDP zu spalten. Von PAP stammende Aktivität war neben der hohen Aktivität der alkalischen Phosphatase aus dem fötalen Kälberserum in LNCaP-Kulturüberständen nicht meßbar.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß DES auf einen biochemischen oder regulatorischen Mechanismus wirkt, der allen untersuchten Zelllinien gemeinsam ist. Worauf beruht die in vivo beobachtete Zelltypspezifität der DESDP-Wirkung? Nach einer DESDP-Infusion kommt es z.B. nicht zu einer allgemeinen Knochenschädigung, sondern es werden die Knochenmetastasen des Tumors angegriffen. Als Erklärung bliebe natürlich immer noch die Phosphataseaktivität auf den Zielzellen, die im Organismus wahrscheinlich ganz anders verteilt ist als in der Kulturschale. Es ist vorstellbar, daß das Abdiffundieren der sekretierten Phosphatase im Gewebe erschwert ist und sich eine höhere lokale Phosphataseaktivität aufbaut (80). Zum anderen ist möglich, daß Prostatazellen einen Anreicherungsmechanismus für Steroidhormone besitzen, der die DES-Konzentrationen in Tumor- und Metastasengewebe auf cytotoxische Werte bringt, während umliegendes Gewebe verschont bliebe. Segal und Mitarbeiter (80) fanden im Zeitraum von 1 bis 8 Stunden nach einer DESDP-Infusion in Prostatagewebe eine 100 fach höhere DES-Konzentration ($2,5 \mu\text{g/g}$) als in Muskel- oder Fettgewebe ($0,025 \mu\text{g/g}$). Die Quantifizierung erfolgte damals mit einer vielleicht nicht so präzisen biologischen Nachweismethode. Die Gewichtszunahme des Uterus nicht geschlechtsreifer Mäuse wurde als Maß des DES-Gehalts von Gewebsextrakten verwendet. Zur Klärung des Mechanismus der DESDP-Wirkung wäre eine Bestätigung dieser Ergebnisse mit modernen analytischen Verfahren sehr wertvoll.

3.7. Zur Qualität der cDNA-Expressionsbibliothek: Lohnt sich weiteres Absuchen?

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand der Aufbau eines Systems zur Erforschung der Androgenregulation beim Menschen. Neben der Verfügbarkeit einer auf Androgene ansprechenden Zelllinie mußte mindestens ein androgenreguliertes menschliches Gen kloniert werden. Als Strategie

wurde der Aufbau einer cDNA-Expressionsbibliothek im Vektorsystem lambda gt11/Y 1088 gewählt. Als zu klonierende Gene kamen in erster Linie PAP und PSA in Frage, da beide von LNCaP exprimiert werden und spezifische, polyklonale Antikörper gegen die Proteine erhältlich sind. Da beide Proteine in LNCaP-Zellen auf Androgenstimulus in gut meßbaren Mengen synthetisiert werden, brauchte die cDNA-Bank nicht absolut repräsentativ und auf die Entdeckung sehr seltener mRNAs ausgelegt sein. Der Umfang einer wirklich repräsentativen cDNA-Bank kann nur geschätzt werden und sollte mehr als $1,7 \cdot 10^5$ unabhängige rekombinante Klone umfassen (81). In dieser Arbeit konnten unter $2 \cdot 10^4$ Rekombinanten 2 immunologisch positive Plaques für PSA und ein positiver für PAP gefunden werden. Daraus läßt sich der Anteil der jeweiligen mRNAs an der gesamten mRNA grob abschätzen auf 1 : 3300 für PSA und 1 : 6600 für PAP. Aus der Hybridisierung der Genbank mit PSA-spezifischer cDNA ergab sich ihr Anteil zu mindestens 1 : 2000 der gesamten mRNA. Um auch die Entdeckung seltenerer mRNAs zu ermöglichen, wurde die Genbank durch Ligierung und in vitro-Verpackung weiterer cDNA-Aliquots auf etwa $2 \cdot 10^5$ unabhängige rekombinante Plaques erweitert.

Nach Größenfraktionierung der cDNA auf einer Gelfiltrationssäule wurden nur Moleküle über 0,5 kb in den Vektor ligiert. Durch den Start der Synthese des 1. Strangs der cDNA am 3'-gelegenen poly-A-Trakt enthalten kürzere cDNA-Inserts überwiegend 3'-nichttranslatierte Sequenzen, die kein Protein codieren und mit Antikörpern kein Signal geben. Inserts unter 0,5 kb wurden bei Testspaltungen rekombinanter Plaques nicht gefunden. Die Genbank sollte geeignet sein, weitere prostataspezifisch exprimierte Gene zu klonieren, sofern Antikörper gegen die Proteine zur Verfügung stehen. Die meisten in letzter Zeit gegen Prostata-Antigene hergestellten Antikörper sind monoklonal (18, 82, 83). Diese sind zum Absuchen einer Expressionsbibliothek weniger geeignet als polyklona-

le Antikörper, weil sie nur ein Epitop auf dem Antigen erkennen. Dennoch wurden mit monoklonalen Antikörpern bereits Klone in Expressionsbanken identifiziert (35).

4. MATERIAL UND METHODEN

Chemikalien, soweit nicht anders angegeben, waren von Merck, Darmstadt. Enzyme, soweit nicht anders angegeben, waren von Boehringer, Mannheim (Boe).

4.1. Zellkultur

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien sind menschlichen Ursprungs. Sie wurden von folgenden Institutionen bezogen:

LNCAp (16), PC-3 (84) und DU 145 (85) (alle 3 aus Prostatakarzinomen): Human Tumor Cell Laboratory, Sloan Kettering Institute for Cancer Research, Rye, N.Y., USA, EJ (Blasenkarzinom): K. Willecke, Universität Essen, KB (Epidermis-Karzinom): American Type Culture Collection, CCL 17, MRC-5 (embryonale Lungenfibroblasten, nicht transformiert mit begrenzter Lebensdauer): Flow Laboratories.

LNCAp-Zellen wurden in RPMI-Medium (Boehringer Mannheim, im folgenden Boe) mit 2 mM Glutamin gehalten, alle übrigen Zelllinien in Dulbecco's MEM (Boe) mit 2 mM Glutamin. Alle Medien enthielten Phenolrot als pH-Indikator und 10% fötales Kälberserum (Boe). Die Zellen wurden kurz vor Erreichen der Konfluenz trypsiniert und im Verhältnis 1:3 (MRC-5, PC-3), 1:4 (LNCAp, KB, Du 145) oder 1:10 (EJ) subkultiviert.

4.2. Tests auf PAP-Synthese und Wachstumsverhalten von LNCAp-Zellen.

Die Zellen wurden bei etwa 75% Konfluenz mit PBS (138 mM NaCl, 3,9 mM KCl, 1,5 mM KH_2PO_4 , 7,2 mM Na_2PO_4 , pH 7,5) gewaschen, trypsiniert (Trypsin von Boe), in Kulturmedium aufgenommen, in einer Neubauer-Kammer gezählt und in

Petrischalen mit 60 mm Durchmesser (P 60) zu je $8 \cdot 10^5$ Zellen in 8 ml Medium ausgesät. Natürliche und synthetische Hormone wurden in 20 μ l Ethanol sofort zugegeben. Kontrollen erhielten Ethanol allein. Testosteron, DHT und Östradiol stammten von Sigma, R1881 (86) von Roussel Uclaf. Zu den jeweils angegebenen Zeiten wurden 200 μ l Kulturüberstand entnommen und auf PAP-Gehalt untersucht. Die PAP-Bestimmung wurde von Frau A. Winter am Klinikum Großhadern der Universität München mit dem Testsystem Enzygnost-PAP der Behringwerke (Marburg) durchgeführt. Die Fehlerspanne dieses Testsystems lag unter 10%. Am Ende der Inkubationsperiode wurden die Zellen aus allen Schalen trypsiniert und in einer Neubauer-Kammer gezählt. Die manuelle Zählung ist gerade bei LNCaP-Zellen der automatischen vorzuziehen, da diese Zellen zum Klumpen neigen. Unter dem Mikroskop kann auch die Zellzahl in kleinen Aggregaten exakt bestimmt werden. Es wurden mindestens 4, oft auch 8 Felder der Kammer ausgezählt. In allen Experimenten wurden für jede Hormonkonzentration 3 parallele Schalen angesetzt.

4.3. Tests auf Cytotoxizität von DES und seinen phosphorylierten Derivaten auf Zelllinien aus verschiedenen Geweben.

DES, DESMP und DESDP wurden von den Asta-Werken, Bielefeld, zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden in folgenden Zahlen in P 60-Schalen ausgesät:

LNCaP, DU 145 und MRC-5 $7 \cdot 10^5$, PC-3, EJ und KB $5 \cdot 10^5$. Außer bei MRC-5 wurden die Hormone sofort in 20 μ l Ethanol (DESDP wurde in PBS gelöst) zugesetzt, bei MRC-5 erst nach 24 h. Nach 120 h (MRC-5 nach 192 h) wurden die Zellen mit PBS gewaschen, trypsiniert und in einer Neubauer-Kammer gezählt. Von der Unterlage abgelöste Zellen wurden beim Waschen mit PBS abgespült, gleich ob sie tot waren oder noch lebten.

Zur Bestimmung der Phosphataseaktivität im Medium wurden 29 µg/ml p-Nitro-phenyl-phosphat eingesetzt. Die Konzentration an Phosphateestern war dann gleich der in 20 µg/ml DESDP. Zur Berechnung der Konzentration wurde mit einem molaren Extinktionskoeffizienten von $18,5 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ gerechnet.

4.4. Präparation von Gesamt-RNA und poly A-haltiger RNA.

RNA wurde ausschließlich unter RNAase-freien Bedingungen gehandhabt. Bidestilliertes Wasser wurde direkt an der Brücke der Destille in Glasgefäße abgefüllt, die 6 h im Trockenschrank bei 180°C sterilisiert worden waren. Alle Puffer wurden durch Filtration durch Nitrozellulose (Nalgene, Rochester, N.Y., USA) mit 0,4 µm Porengröße von Zellen, Sporen und Proteinen befreit. Unsterile Plastikgefäße und Glassäulen wurden silikonisiert (2% Dichlordimethylsilan in 1,1,1-Trichlorethan, BDH).

Für eine RNA-Präparation wurden LNCaP-Zellen in 10 bis 20 P 150-Schalen eingesät, mit 20 ng/ml R1881 versetzt und bis etwa 80% Konfluenz wachsen gelassen. Das Medium wurde abgesaugt und 5 ml Lysepuffer (3 M LiCl, 6 M Harnstoff, 30 mM Na-acetat, pH 6, Ref. 87) wurden direkt in die Schale gegeben, die lysierten Zellen wurden zusammengespißt und diese Flüssigkeit wurde in die nächste Schale transferiert. Für 10 Schalen wurden etwa 15 ml Lysepuffer verwendet. Die zelluläre DNA wurde in einem HO4 Homogenisator (Edmund Bühler Laborgeräte, Tübingen) durch rotierende Messer mechanisch zerkleinert. RNA wurde über Nacht bei 0 bis 4°C ausgefällt und 10 min bei 10000 rpm im Sorvall HB-4 Rotor abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit der wäßrigen Phase Na-acetat gepuffer-ten Phenols (88) aufgenommen und 2 bis 3 mal mit diesem Phenol extrahiert. Um Reste von DNA und Polysacchariden zu entfernen wurde die RNA anschließend noch 2 mal aus 3 M LiCl (87) und 2 mal aus 3 M Na-acetat pH 6 (89) ge-

fällt. Salz wurde durch Ethanol-fällung aus 250 mM Ammoniumacetat entfernt. Gesamt-RNA wurde als feuchtes Ethanolpellet bei -20 oder -70°C aufbewahrt.

RNA-Gele (38) von 1 mm Dicke wurden zwischen Glasplatten gegossen, die mit einem Silikonschlauch abgedichtet waren. Die Agarose (Marine Colloids, Medium EEO) wurde in der Harnstofflösung so kurz wie möglich gekocht, um die Zersetzung des Harnstoffs in CO_2 und NH_3 zu begrenzen. Die Gele wurden mindestens 4 h oder besser über Nacht zum Erstarren auf Eis gelegt. Zum Entfernen des Kamms wurde eine Glasplatte abgenommen und anschließend wieder angeklammert. Dickere Agarose-Harnstoff-Gele als 1 mm bekamen während des Laufs häufig Risse. RNA-Proben von 1 bis 3 μg wurden in 6 bis 8 M Harnstoff, 0,1% SDS und 0,1% Bromphenolblau aufgetragen. Die Elektrophorese-Apparatur besaß eine Diffusionssperre zwischen den Elektroden und dem Gel, da die Pufferkapazität sonst nicht ausgereicht hätte. Die Gele wurden nach dem Lauf (3 bis 4 Stunden bei 80 bis 120 V) in 200 ml Ethidiumbromid-Lösung (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 5 bis höchstens 10 min angefärbt. RNA wurde unter UV-Licht sichtbar gemacht.

Auch Oligo dT-Zellulose (90) hoher Qualität (Typ T3, Collaborative Research) enthält extrem kleine Partikel, die von den meisten Säulenfritten nicht zurückgehalten werden und daher sehr leicht in eine Präparation von poly A-haltiger RNA hineingeraten. Um die Kontamination mit Zellulosepartikeln zu begrenzen, wurden verschiedene Methoden angewandt.

a) In einem neuen sterilen Plastikgefäß wurde Oligo dT-Zellulose eingewogen (berechnet auf die angegebene Kapazität ein etwa 3 bis 5 facher Überschuß), mit Gesamt-RNA in Bindungspuffer (0,5 M NaCl, 10 mM Tris, pH 7,5) versetzt und 1 h lang leicht geschüttelt. Die Zellulose wurde abzentrifugiert, der Überstand mit der poly A⁻-RNA abgenommen und die Zellulose 2 mal mit Bindungspuffer gewaschen. Poly A-haltige RNA wurde mit 3 mal 200 μl Wasser eluiert, in der Eppendorf-Zentrifuge von größeren

Partikeln befreit und anschließend durch Millipore-Filter ($0,2 \mu\text{m}$) filtriert. Dabei blieben auch sehr kleine Partikel im Filter hängen.

b) In einer silikonisierten Pasteurpipette mit einer Fritte aus silikonisierter Glaswolle wurden $0,5 \text{ g}$ Oligo dT-Zellulose 24 h mit Bindungspuffer vorgewaschen, um die kleinen Partikel möglichst vollständig auszuspülen. Bindung der poly A-haltigen RNA erfolgte in Bindungspuffer (s.o.), die Elution mit Wasser.

Als zusätzliche Reinigung wurde poly A-haltige RNA durch ein Kissen von $5,7 \text{ M CsCl}$ zentrifugiert (91).

4.5. Herstellung und Tests der lambda gt11 Vektor-DNA und der Verpackungsextrakte.

Als Medium für die Anzucht der Wirtsstämme Y 1088 und Y 1090 (33) wurde NZCYM (92) mit $0,2\%$ Maltose und $50 \mu\text{g/ml}$ Penicillin (Bayer) verwendet. Plating cells (Y 1088 oder Y 1090) für die Titerbestimmung wurden aus einer Einzelkolonie von einer Ägarplatte mit Penicillin ($50 \mu\text{g/ml}$) in 20 ml Medium angeimpft und über Nacht wachsen gelassen. Am nächsten Tag wurde die optische Dichte bei 580 nm bestimmt. Die Zellen wurden abzentrifugiert und in 10 mM MgCl_2 zu etwa $1,5 \cdot 10^9$ Zellen/ml suspendiert ($1 A_{580}\text{-Einheit} = 8 \cdot 10^8$ Zellen/ml). Sie wurden bei 4°C aufbewahrt und konnten ca. eine Woche verwendet werden. Für Titerbestimmungen wurden Platten ohne Grundagar verwendet, dafür wurden 7 ml Weichagar in eine P 100-Schale gegeben.

Für die Anzucht von lambda gt11 wurden verschiedene Verhältnisse von Bakterien zu Phagen ausgetestet. $100:1$ bis $1000:1$ lieferte die besten Phagenausbeuten. Lambda gt11 DNA wurde genau nach Man. präpariert. Die Eco RI-Spaltung (50 facher Überschuß an Enzym von Biolabs, mindestens 4 h bei 37°C) und Phosphatasebehandlung wurden gleichzeitig durchgeführt. Anschließend wurde die DNA 3 mal phenolisiert (Phenol nach Ref. 92). Die Vollständig-

keit der Eco RI-Spaltung wurde stets auf horizontalen 0,3% Agarosegelen (92) überprüft. Anschließend wurden Testligierungen und in vitro-Verpackungen mit einem 0,6 kb Insert durchgeführt, um den Anteil nicht-rekombinanter Plaques festzustellen. 1 µg Vektor-DNA wurde mit 10 ng Insert in 5 µl ligiert (92), als Kontrollen wurde Vektor-DNA allein mit und ohne Ligasebehandlung in vitro verpackt.

Verpackungsextrakte wurden genau nach (37) hergestellt. Die Ausgangsstämme BHB 2688 und BHB 2690 wurden vor jeder neuen Präparation durch Überimpfen von Einzelkolonien auf frische Agarplatten bei 30°C von eventuellen Kontaminationen gereinigt. Nach Beendigung der Synthese von Phagenprotein wurde an einem Aliquot der Anzucht getestet, ob die Zellen mit Chloroform lysierbar sind. Nur bei vollständiger Lyse der Probe mit Chloroform wurde die Aufarbeitung begonnen.

Kleinanzüchten rekombinanter Plaques.

Einzelne gelegene rekombinante Plaques wurden mit samt dem Weichagar abgenommen und in 0,5 ml SM (92) 1 h geschüttelt. Die Phagensuspension enthielt dann etwa 10^6 infektiöse Partikel. 50 µl davon wurden mit 0,2 ml plating cells auf einer P 100 Schale ausplattiert. Das ergab meist konfluente Lyse. Von dieser Platte wurden die Phagen in 3 ml SM abgespült und 0,5 ml dieser Suspension zum Animpfen einer größeren Anzucht (500 ml einer Y 1090-Kultur von 0,8 OD_{580}) verwendet. Daraus wurde lambda-DNA entweder nach Ref. 92, jedoch ohne CsCl-Gradienten, isoliert, oder aber nach einer modifizierten Prozedur mit lambda-Sorb (Promega). 30 ml der klarzentrifugierten Anzucht wurden in einem Corex-Röhrchen mit 0,2 ml lambda-Sorb-Suspension versetzt und über Nacht in Eis inkubiert. Am nächsten Tag wurde lambda-Sorb im Sorvall HB-4 Rotor 5 min bei 7000 rpm abzentrifugiert und 3 mal mit 20 ml SM (92) gewaschen. DNA wurde in einem Puffer mit 5 mM EDTA bei 70°C freigesetzt, mit Proteinase K

(Merck) und Phenolextraktion gereinigt. 0,2 ml lambda-Sorb banden 10^{12} Phagen und lieferten ca. 25 μg lambda-DNA, die etwa dieselbe Menge kleiner Nukleinsäuren enthielt.

4.6. Synthese der cDNA.

Die Synthese der cDNA wurde nach verschiedenen veröffentlichten Prozeduren zusammengestellt (41, 44, 92). Alle Lösungen und Gefäße wurden RNase-frei gemacht. Das etwas modifizierte Verfahren nach Gubler und Hoffman (41):

3 μg poly A-haltige RNA wurden in 10 μl 40 mM $\text{CH}_3\text{-Hg-OH}$ (39, Ventron) 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden für die Synthese des 1. Strangs zugegeben:

- 1 μl 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Oligo dT₍₁₀₋₁₅₎
- 1 μl 0,7 M Mercaptoethanol
- 4 μl 5 fach Reaktionspuffer
- 1 μl 80 mM NaPP_i
- 1 μl dNTP-Mix, mit Tris neutralisiert (dCTP 10 mM, übrige 20 mM)
- 1 μl RNasin (12 U/ μl , Ref. 93, Sigma)
- 1 μl 20 U/ μl reverse Transkriptase (Life Sciences, St. Petersburg, Florida, USA)
- 0,1 μl ^{32}P -dCTP (NEN, 800 Ci/mmol, 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$)

5 fach Reaktionspuffer: 0,5 M Tris, pH 8,3 bei 42°C
 50 mM MgCl_2
 0,5 M KCl

Die Synthese des 1. Strangs wurde 40 min bei 42°C durchgeführt. 1 μl wurde für ein Alkaligel entnommen, mit 2 μg Hefe-tRNA versetzt und 2 mal phenolisiert. Nicht phenolisierte Proben wanderten nicht in das Gel ein. Alkaligele wurden präpariert nach Ref. 92. Sie wurden 1 bis 2 mm dick zwischen Plastikplatten gegossen und 1,5 h bei 100 V elektrophoretisiert. Als Farbstoff wurde in einer

Tasche Bromphenolblau aufgetragen, das im Gel langsam ausbleicht. DNA-Einzelstränge unter 0,5 kb laufen schneller als Bromphenolblau.

Für die Synthese des 2. Strangs wurde das Volumen vergrößert und der Puffer angepaßt. Es wurden zugesetzt:

60 µl	H ₂ O
4 µl	1 M HCl
1,6 µl	250 mM MgCl ₂
8 µl	1 M KCl
2 µl	0,13 U/µl RNase H
4 µl	5 U/µl Polymerase I

Die Synthese des 2. Strangs wurde bei 13 bis 16°C über Nacht durchgeführt.

Potentielle Eco RI-Stellen in der cDNA wurden methyliert. Dazu wurden zugesetzt:

4 µl	250 mM CDTA
1 µl	8 mM S-Adenosyl-Methionin in H ₂ SO ₄ , pH 3
1 µl	20 U/µl Eco RI-Methylase, enthält noch Eco RI-Restriktionsnuklease (Biolabs)

Anschließend wurde die cDNA phenolisiert und in die Linker-Ligase-Reaktion eingesetzt.

Die modifizierte cDNA-Synthese nach (44):

5 µg poly A-haltige RNA in 83 µl bidestilliertem Wasser wurden 3 min auf 70°C erhitzt und auf Eis abgeschreckt. Danach wurden zugesetzt:

12,5 µl	10 fach Reaktionspuffer
12,5 µl	dNTP-Mix (alle je 10 mM, mit NaOH neutralisiert)
12,5 µl	0,1 mg/ml Oligo dT ₍₁₀₋₁₅₎

2 μ l 25 U/ μ l reverse Transkriptase (Boe)
 2 μ l 32 P-dCTP (NEN)

10 fach Reaktionspuffer: 0,5 M Tris, pH 8,5 (eingestellt
 bei Raumtemperatur)

0,4 M KCl

0,1 M MgCl_2

4 mM Dithiothreitol

Die Synthese des 1. Strangs wurde in 1 h bei 42°C durchgeführt. Danach wurde das Gemisch 1,5 min gekocht und auf Eis abgeschreckt. Denaturiertes Protein wurde 10 min in der Eppendorf-Zentrifuge sedimentiert. Das Pellet wurde mit 125 μ l Reaktionspuffer gewaschen, und die beiden Überstände wurden vereinigt.

Zur Synthese des 2. Strangs wurden 37 U Klenow-Polymerase zugesetzt. Die Reaktion wurde über Nacht bei 14 bis 15°C inkubiert.

Die Entfernung der Haarnadelschleife an der cDNA geschah mit S1-Nuklease. Zum Reaktionsvolumen von 250 μ l wurden zugesetzt:

1 ml H_2O
 1,25 ml 2 fach S1-Puffer
 6 μ l 400 U/ μ l S1-Nuklease

2 fach S1-Puffer: 60 mM Na-acetat, pH 4,4

0,5 M NaCl

3 mM ZnCl_2

Die Reaktion wurde 15 bzw. 30 min bei 25°C durchgeführt, anschließend durch Zusatz von 50 μ l 0,25 M EDTA gestoppt. Es folgte eine Extraktion mit Phenol/Chloroform (1:1), sowie 3 Extraktionen mit Tris (100 mM, pH 7,5) gesättigtem Äther. Der Äther wurde aus dem geöffneten Gefäß abgedampft. Die cDNA wurde durch Zusatz von Hefe-

tRNA auf 5 µg/ml und Ethanol fällung konzentriert. Zur gründlichen Entfernung organischen Lösungsmittels wurde 2 mal mit Ethanol aus 0,2 M LiCl umgefällt. Anschließend wurde die cDNA über eine NEN-Sorb-Säule (New England Nuclear) gereinigt und gefriergetrocknet.

Zur Methylierung wurde die trockene cDNA aufgenommen in
 30 µl 50 mM Tris
 2 mM EDTA
 5 mM Dithiothreitol

Zu dieser Lösung wurden zugesetzt:

3 µl 0,1 mM S-Adenosyl-Methionin in H₂SO₄, pH 3,0
 1 µl 20 U/µl Eco RI-Methylase (Biolabs)

Die Methylierung wurde bei 37°C 15 min durchgeführt. Danach wurde 10 min auf 70°C erhitzt.

Zur Sicherheit wurde noch einmal mit Polymerase I behandelt, um den Anteil der Moleküle mit glatten Enden zu erhöhen. Dazu wurden zugesetzt:

4 µl 0,1 M MgCl₂
 4 µl verdünnter dNTP-Mix (alle je 0,2 mM)
 1,5 µl 5 U/µl Polymerase I

Die Reaktion wurde 15 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Anschließend wurde 2 mal mit Phenol/Chloroform (1:1) und 2 mal mit Chloroform extrahiert, 2 mal aus 0,3 M Na-acetat Ethanol-gefällt und es wurde eine Reinigung über NEN-Sorb durchgeführt.

Eco RI-Linker wurden mit selbst hergestelltem (94) oder von NEN bezogenem gamma-³²P-ATP radioaktiv markiert. Die Polynukleotid-Kinase (PNK) Reaktion wurde nach Ref. 92 durchgeführt. Dazu wurden zusammengegeben:

4 μ l Eco RI-Linker (8 bp, Boe), 5'-dephosphoryliert,
 2,5 μ g/ μ l in PNK-Puffer
 0,5 μ l 10 fach PNK-Puffer
 4 μ l gamma-³²P-ATP
 1 μ l 4,5 U/ μ l PNK

Nach einer Inkubation von 10 min bei 37°C wurden 0,5 μ l 10 mM kaltes ATP zugesetzt und das Reaktionsgemisch wurde weitere 20 min bei 37°C inkubiert, um die Linkermoleküle vollständig zu phosphorylieren.

Auch die cDNA mußte vor der Ligierung mit dem Linker mit PNK behandelt werden, da der Oligo dT-Primer am 5'-Ende kein Phosphat trug. Die trockene cDNA wurde in folgendem Gemisch gelöst:

4 μ l PNK-Puffer
 1 μ l 5 mM ATP
 0,5 μ l 4,5 U/ μ l PNK

Nach einer Inkubation von 30 min bei 37°C wurden für die Ligierung an den Linker zugesetzt:

3 μ l radioaktiv markierter Linker, $2,5 \cdot 10^7$ cpm/ μ g,
 0,5 μ g/ μ l
 1 μ l 1 U/ μ l T4-DNA-Ligase

Die Ligierung wurde 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 14°C durchgeführt.

Für die Eco RI-Abspaltung der überzähligen Linkermoleküle wurden 11 μ l der folgenden Lösung zugegeben:

50 mM Tris, pH 7,5
 10 mM MgSO_4
 0,2 M NaCl

Die Ligase wurde durch Erhitzen für 10 min auf 70°C inaktiviert. 1,5 μl 20 U/ μl Eco RI (Biolabs) wurden zugesetzt und die Spaltung 1 h bei 37°C durchgeführt. Um die eine möglichst vollständige Abspaltung der Linker zu erreichen, wurden noch einmal 25 μl Eco RI-Puffer (Boe) und 2,5 μl Eco RI (Biolabs) zugesetzt und die Inkubation weitere 90 min bei 37°C fortgesetzt. Daraufhin wurde die cDNA einmal mit Phenol/Chloroform (1:1) extrahiert, mit Ethanol aus 2 M Ammoniumacetat (41) gefällt und auf einer Gelfiltrationssäule (44) nach Größe fraktioniert.

Eine silikonisierte 1 ml Glaspipette wurde an der Spitze mit einem Stück Nylongewebe und einem darübergestülpten Silikonschlauch abgedichtet und eine Säule aus Biogel A-50m darin gegossen. Das Säulenbett war etwa 35 cm hoch. Die Säule wurde mit 80 cm hydrostatischem Druck betrieben. Der Säulenpuffer war (44):

10 mM Tris, pH 7,5
 0,1 M NaCl
 1 mM EDTA

Fraktionen von je 2 Tropfen wurden in Nethelern auffangen und Cerenkov-Counts gezählt. Aliquots aus cDNA enthaltenden Fraktionen wurden mit Alkaligelen oder mit nicht-denaturierenden DNA-Gelen (92) auf Länge der cDNA getestet. Nur cDNA-Fragmente über 0,5 kb wurden zur Ligierung mit dem Vektor eingesetzt.

DNA-Längenstandards wurden nach Standardverfahren (92) aus pBR 322 (95) mit oder ohne Insert oder aus CV-1-Zellen (Grüne Meerkatze) hergestellt.

4.7. Ligierung der cDNA mit lambda gt11-DNA.

Etwa ein Siebtel einer cDNA-Präparation wurde zusammen mit 1 µg Vektor-DNA in 5 µl ligiert und wie bei Sca-lenghe et al. (37) beschrieben in vitro verpackt. Mit den so erhaltenen Phagen wurden Y 1088-Zellen infiziert und mit X-gal und IPTG enthaltendem Weichagar (92) plattiert. Bei ausreichendem Anteil rekombinanter (weißer, galaktosidase-negativer) Plaques wurden einzelne weiße Plaques isoliert, angezogen und auf Länge des Inserts getestet.

4.8. Absuchen der Expressionsgenbank mit PSA- und PAP-spezifischen Antikörpern.

Kaninchenserum gegen PSA (96) und gegen PAP waren von Dakopatts A/S (Dänemark). Das Absuchen wurde durchgeführt nach einem Protokoll aus dem Institut Pasteur, Paris. Pro Experiment wurden 8 P 100 Schalen mit LB-Agar ohne Glukose (92) gegossen und mindestens eine Nacht mit geklipptem Deckel im 37°C-Raum trocknen gelassen. Das ist wichtig, da sonst der Weichagar am Nitrozellulosefilter hängen bleibt. Auf 6 dieser Platten wurde die Genbank mit Y 1090 in einer Dichte von 8000 bis maximal 10000 Plaques pro Schale ausplattiert, auf die restlichen beiden wurde lambda gt11 zu konflüenter Lyse plattiert. Weichagar war in NZCYM. Die Schalen wurden bei 42°C so lange inkubiert, bis winzige Plaques soeben sichtbar wurden. Das dauerte 2 bis 3 h. Passende Nitrozellulosefilter (BA 85, Schleicher und Schuell) wurden mit 10 mM IPTG getränkt und auf einer Kunststoffolie getrocknet. Diese Filter wurden auf die Schalen ohne Verrutschen aufgelegt. Die Schalen wurden 2 bis 3 h bei 37°C weiterinkubiert. Die Lage der Genbank-Filter auf dem Agar wurde mit gut sichtbaren Nadelstichen markiert. Die Filter wurden vorsichtig so abgehoben, daß sie auf dem Agar nicht rutschten und kein Weichagar an den Filtern haften

blieb. Zuerst wurden die beiden lambda gt11-Filter abgenommen, in TBS (50 mM Tris, pH 8, 0,15 M NaCl) abgespült und 15 bis 30 min in TBS mit 20% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FKS, Boe) und 0,5% BSA (Boe) leicht geschüttelt. Sodann wurden sie in eine Lösung von TBS, 20% FKS, 0,5% BSA mit 1:300 verdünntem erstem Antikörper (gegen PSA oder PAP) gebracht und mindestens 1 h leicht geschüttelt. Die Genbank-Filter wurden ebenfalls mit TBS gespült und in TBS mit FKS und BSA vorbehandelt. Dann wurden die lambda gt11-Filter aus der Antikörper-Verdünnung entfernt und verworfen und die Genbank-Filter in dieser Lösung 3 bis 4 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C leicht geschüttelt. Das Abwaschen überschüssigen ersten Antikörpers geschah 10 min mit TBS, 10 min mit TBS mit 0,1% Triton-X-100 (Spezialqualität für Molekularbiologie, Boe), 10 min mit TBS, 2 min mit TBS mit 20% FKS. Nach den Waschschritten wurden die Filter in eine 1:500 Verdünnung des Peroxidase-gekoppelten Antikörpers gegen Kaninchen-IgG (Clontech, Palo Alto, USA) in TBS mit 20% FKS gelegt und mindestens 1 h bei Raumtemperatur leicht geschüttelt. Die Waschschriffe außer mit FKS wurden wiederholt. Während des Schüttelns mit TBS wurden 100 ml Entwicklerlösung für die Peroxidasereaktion angesetzt:

50 mM Tris, pH 7,6

0,05% Diaminobenzidin (Sigma)

Zu 100 ml dieser Lösung wurden 1,5 ml 2% $\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ und 1,5 ml 2% $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ gegeben.

Kurz vor Eintauchen des Filters wurden 33 μl 30% H_2O_2 auf 100 ml Entwicklerlösung zugesetzt. Die Farbreaktion setzte sehr rasch ein und mußte innerhalb von 5 min gestoppt werden, um die Hintergrundfärbung zu begrenzen. Die Filter wurden mit Wasser abgespült und an der Luft getrocknet.

4.9. Umklonieren in M13, Sequenzierung und Sequenzvergleich.

Diese Arbeitsschritte wurden in Anlehnung an Protokolle von Rolf Stucka durchgeführt (47).

Ein Plaque mit einem PSA-spezifischen Insert wurde angezogen, Phagen-DNA mit lambda-Sorb isoliert und mit Eco RI präparativ gespalten. Die cDNA wurde aus einem Agarosegel mit GeneClean (BIO 101, La Jolla, USA) eluiert und in die Eco RI-Stelle von M13 mp10 und M13 mp11 ligiert. Die Präparation der M13-DNA und die Ligierung erfolgten nach Standardmethoden (92). *E. coli* JM 103 wurden nach Dagert und Ehrlich (97) transformiert, mit 0,1 ml einer über Nacht in Minimalmedium gewachsenen Kultur von JM 103 (kann im Kühlschrank mehrere Wochen aufbewahrt werden) versetzt und in YT-Weichagar (92) mit X-gal und IPTG plattiert. Farblose Plaques wurden mit einem sterilen Zahnstocher abgenommen, in 5 ml YT Medium mit 50 µl aus einer JM 103-Kultur in Minimalmedium Überimpft und mindestens 6 h bei 37°C inkubiert. Die Bakterien wurden abzentrifugiert und die replikative Form von M13 wie ein Plasmid aus ihnen isoliert (98) und auf Agarosegelen analysiert. Die Einzelstrang-DNA wurde aus dem Überstand präpariert und zur Sequenzierung verwendet. Der Sequenzprimer mit 17 Basen (Boe) wurde 15 min bei 37°C an die M13-DNA hybridisiert. Die Sequenzreaktion wurde unter Verwendung von Klenow-Polymerase und alpha-³²P-dATP (NEN) 20 min bei Raumtemperatur in einer Eppendorf-Zentrifuge durchgeführt. Zugeseetzte Reagenzien wurden in die Spitzen der Netheler zentrifugiert. Dadurch starteten alle Reaktionen gleichzeitig. Sequenzgele waren 6% Acrylamid und 0,3% Bisacrylamid (Serva). Eine Glasplatte wurde mit dem Allylsilan GF-31 (Wacker-Chemie), die andere mit Dichlordimethylsilan (BDH) silikonisiert. Die Gele wurden ohne Abkleben der Ränder gegossen.

Um aus Klon 1 die Sequenz vom Stopcodon bis zur Bam HI-Spaltstelle zu erhalten, wurde mit Hilfe eines DNA Synthesizers Modell 3810 der Firma BioSearch ein Sequenzprimer nach einer bereits sequenzierten Basenfolge synthetisiert (5'-GACCAGGCCAAGACT-3').

Der Sequenzvergleich mit der veröffentlichten Aminosäuresequenz wurde mit dem Programmsystem der University of Wisconsin Genetics Computer Group an einer Micro-Vax Rechenanlage durchgeführt.

4. 10. Hybridisierung mit PSA-spezifischer cDNA.

Das als Probe verwendete DNA-Fragment wurde mit Gene-clean (BIO 101, La Jolla, USA) aus einem Agarosegel isoliert und durch DNA-Synthese, die an Zufalls-Oligonukleotiden gestartet wurde, mit alpha-³²P-dATP (NEN) radioaktiv markiert. Dazu wurde ein Kit der Firma Boe verwendet. Die Probe wurde ohne Abtrennung nicht eingebauter Nukleotide zur Hybridisierung eingesetzt. Die Plaque-Hybridisierung wurde in Abwandlung der Methode von Benton und Davis (99) durchgeführt. Als Filter wurden Membranen auf Nylonbasis (Colony/Plaque Screen, NEN) verwendet und nach Angaben des Herstellers behandelt und hybridisiert. Der letzte Waschschrift wurde in 4 * SSC bei 68°C durchgeführt.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Sowohl das molekularbiologische als auch das klinische Interesse an der Androgenregulation der Expression bestimmter menschlicher Gene sowie der Zellproliferation waren maßgeblich für die Zielsetzung dieser Arbeit.

Das Studium der Androgenregulation setzt die Kenntnis der Struktur androgenregulierter Gene voraus. Das Prostata-spezifische Antigen (PSA) und die Prostata-spezifische Saure Phosphatase (PAP) werden zur Verlaufskontrolle von Prostatakarzinomen verwendet und besitzen auch klinische Bedeutung. An der Klonierung dieser beiden Gene bestand daher besonderes Interesse. Als Quelle für PSA- und PAP-spezifische mRNA und als *in vitro* Modell zur Untersuchung der Androgenregulation wurde die Zelllinie LNCaP ausgewählt.

Es gab Hinweise in der Literatur, daß LNCaP sowohl die Prostata-spezifische Saure Phosphatase (PAP) als auch das Prostata-spezifische Antigen (PSA) synthetisiert. Die Expression beider Markerproteine und ihre Androgenregulation mußten zunächst genauer untersucht werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Hormonregulation der PAP-Synthese in LNCaP-Zellen studiert. Die natürlichen Androgene Testosteron und Dihydrotestosteron (DHT) induzieren gleich gut, der Effekt ist eindeutig dosisabhängig. 1 µg/ml führen zu einer Verdreifachung der Menge immunologisch nachweisbarer PAP im Kulturüberstand. Das synthetische Androgen R1881 stimuliert bereits in der geringsten getesteten Konzentration von 10 ng/ml stärker als die hundertfache Konzentration an Testosteron und DHT. Eine Erhöhung der R1881-Konzentration brachte keine weitere Steigerung der Syntheserate von PAP.

Die Bestimmung der Zellzahlen am Ende jedes Experimentes ergab, daß die Proliferation der LNCaP-Zellen durch R1881 deutlich gehemmt wird. Die Endzellzahlen in den

R1881 behandelten Kulturen lagen stets um 50 bis 80% unter den Kontrollen. Tote oder offensichtlich geschädigte Zellen wurden nicht beobachtet. Wie bei der Stimulierung der PAP-Synthese wird auch bei der Hemmung der Zellteilung bereits mit 10 ng/ml der volle Effekt erzielt. Die Hemmung der Proliferation von LNCaP-Zellen durch ein synthetisches Androgen deutet auf einen Zusammenhang mit klinischen Beobachtungen, nach denen bei einigen Prostatakarzinom-Patienten auf Verabreichung von Testosteron eine deutliche Besserung des Zustandes eintrat. Es erscheint bemerkenswert, daß in vitro eine hundertfache Konzentration des synthetischen Östrogens DES nötig ist, um eine Reduktion der Zellzahl im gleichen Ausmaß wie mit R1881 zu erzielen.

Das natürliche Steroid Östradiol stimuliert die PAP-Synthese erst bei 1 µg/ml, und deutlich schwächer als Androgene. Diese Stimulierung ist Überraschend, da bei Patienten als Reaktion auf eine Östrogentherapie meist ein Abfall des Serumspiegels an PAP eintritt, wohl in erster Linie als Folge des Absterbens von Krebszellen.

Um regulatorisch wichtige Nukleotidsequenzen in der Nähe androgenstimulierbarer Gene zugänglich zu machen, mußte ein androgenreguliertes Gen kloniert werden. Aus R1881-stimulierten LNCaP-Zellen konnte intakte poly A-haltige RNA isoliert und daraus doppelsträngige cDNA synthetisiert werden. Mit dieser cDNA wurde eine Expressionsgenbank in lambda gt11 angelegt. Sie umfaßt $2 \cdot 10^5$ unabhängige rekombinante Klone mit einer Insertlänge von mindestens 0,5 kb. Unter $2,5 \cdot 10^4$ rekombinanten Klonen wurden 2 gefunden, die mit Antikörpern gegen PSA ein reproduzierbares Signal zeigten, sowie einer, der mit Antikörpern gegen PAP reagierte. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine PSA-spezifische cDNA durch Restriktions- und Sequenzanalyse näher charakterisiert. Die cDNA ist 0,9 kb lang, enthält etwa 0,15 kb poly A, 0,58 kb 3'-nicht-translatierten Bereich, das Stopcodon TGA und 55 Codons für Aminosäuren aus dem C-terminalen Bereich des Struk-

turgens. Diese entsprechen vollständig den Positionen 186 bis 240 aus der publizierten Aminosäuresequenz. Damit ist bewiesen, daß es sich um eine PSA-spezifische cDNA handelt.

Mit Hilfe dieser Nukleinsäure-Probe wurden 11 weitere PSA-spezifische cDNA-Klone aus der lambda-Genbank isoliert, um auch den 5'-Teil der PSA-Sequenz zu erhalten. Über genomische Klone aus einer Cosmid-Genbank wird die 5'-Flanke mit den vermuteten Regulationssequenzen zugänglich.

Die Überprüfung des vorgeschlagenen Wirkungsmechanismus des synthetischen Östrogens DES und seiner phosphorylierten Derivate DESMP und DESDP an Prostatakarzinom- und anderen Zellen erschien sinnvoll, um eventuell einen Ansatz zur Verbesserung der Therapie zu finden. Oral verabreichtes DES (3 bis 5 mg/Tag) führt zu Plasmakonzentrationen im Bereich von 2 bis 4 ng/ml und senkt den Androgenspiegel bei Patienten drastisch. In dieser Arbeit konnte bis 100 ng/ml DES gegen LNCaP-Zellen kein hemmender Effekt nachgewiesen werden. Niedrig dosiertes DES scheint in der Therapie allein über die Hypophysen-Gonaden-Achse durch Senkung des Testosteronspiegels zu wirken.

In Konzentrationen, wie sie während DESDP-Infusionen auftreten, wirken DES, DESMP und DESDP cytotoxisch auf Zelllinien aus folgenden Geweben: PAP exprimierendes Prostatakarzinom (LNCaP), PAP-negatives Prostatakarzinom (PC-3 und DU 145), Blasenkarzinom (EJ), Epidermiskarzinom (KB), und nicht transformiertes embryonales Lungengewebe (MRC-5). Alle Zelltypen wurden etwa im gleichen Ausmaß gehemmt. Tote und sterbende Zellen in den Kulturen zeigten, daß es sich um einen cytotoxischen Effekt handelt. Bei MRC-5 Zellen wurde außer der Wachstumshemmung auch eine morphologische Veränderung beobachtet: Foci polygonaler Zellen tauchten zwischen den typischen spindelförmigen Fibroblasten auf. Eine Zelltypspezifität oder eine wesentliche Verstärkung des cytotoxischen Ef-

fekts von DESDP gegenüber Phosphatase-produzierenden LNCaP-Zellen im Vergleich mit Phosphatase-negativen Zellen konnte nicht gefunden werden. Daraus kann geschlossen werden, daß DES und seine phosphorylierten Abkömmlinge wahrscheinlich auf einen biochemischen oder regulatorischen Mechanismus wirken, der allen untersuchten Zelltypen gemeinsam ist. Die Nebenwirkungen hoher Dosen synthetischer Östrogene hängen möglicherweise mit ihrer generellen Cytotoxizität zusammen. Allein die völlig verschiedenen Dosis-Effekt-Beziehungen deuten darauf hin, daß DES und R1881 nicht über einen gemeinsamen Mechanismus wirken.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. K.R. Yamamoto, *Annu. Rev. Genet.* 19, 209-252 (1985)
2. H. Gronemeyer und O. Pongs, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 2108-2112 (1980)
3. B. Dworniczak, R. Seidel und O. Pongs, *EMBO J.* 2, 1323-1330 (1983)
4. S. Green und P. Chambon, *Nature* 324, 615-617 (1986)
5. C. Scheidereit, S. Geisse, H.M. Westphal und M. Beato, *Nature* 304, 749-752 (1983)
6. M. Karin, A. Haslinger, H. Holtgreve, R.L. Richards, P. Krauter, H.M. Westphal und M. Beato, *Nature* 308, 513-519 (1984)
7. C. Scheidereit, P. Krauter, D. von der Ahe, S. Janich, O. Rabenau, A.C.B. Cato, G. Suske, H.M. Westphal und M. Beato, *J. Steroid Biochem.* 24, 19-24 (1986)
8. J.B.E. Burch und H. Weintraub, *Cell* 33, 65-76 (1983)
9. P.B. Becker, R. Renkawitz und G. Schütz, *EMBO J.* 3, 2015-2020 (1984)
10. H.P. Fritton, T. Igo-Kemenes, J. Nowock, U. Strech-Jurk, M. Theisen und A.E. Sippel, *Nature* 311, 163-165 (1984)
11. N.K. Rushmere, M.G. Parker und P. Davies, *Mol. Cell. Endocrinol.* 51, 259-265 (1987)
12. M. Mbikay, S. Nolet, S. Fournier, S. Benjannet, P. Chapdelaine, G. Paradis, J.Y. Dubé, R. Tremblay, C. Lazure, N.G. Seidah und M. Chrétien, *DNA* 6, 23-29 (1987)
13. K.W.K. Watt, P.-J. Lee, T. M'Timkulu, W.-P. Chan und R. Loor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 3166-3170 (1986)
14. M.-F. Lin, C.-I. Lee, F.S. Sharief, S.S.-L. Li und T. Ming Chu, *Cancer Res.* 43, 3841-3846 (1983)
15. R.W. Hudson, *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 59, 949-956 (1981)
16. J.S. Horoszewicz, S.S. Leong, T.M. Chu, Z.L. Wajzman, M. Friedman, L. Papsidero, U. Kim, L.S. Chai, S. Kakati, S.K. Arya und A.A. Sandberg, *Prog. Clin. Biol. Res.* 37, 115-132 (1980)

17. J.S. Horoszewicz, S.S. Leong, E. Kawinski, J.P. Karr, H. Rosenthal, T. Ming Chu, E.A. Mirand und G.P. Murphy, *Cancer Res.* 43, 1809-1818 (1983)
18. R.H. Raynor, T.A. Hazra, C.W. Moncure und T. Mohanakumar, *J. Natl. Cancer Inst.* 73, 617-623 (1984)
19. M.R.G. Robinson und B.S. Thomas, *Br. Med. J.* IV (1971), 391-394
20. H. Druckrey und N. Brock, *Münch. med. Wschr.* 35, 1626-1629 (1960)
21. P.L. Rohlf und R.H. Flocks, *J. Iowa Med. Soc.* 59, 1096-1098 (1969)
22. H. Oelschläger, D. Rothley und U. Dunzendorfer, *Drug Res.* 34, 1333-1336 (1984)
23. M.M. Webber, P.K. Horan und T.R. Bouldin, *Invest. Urol.* 14, 335-343 (1977)
24. W.A. Nelson-Rees und R.R. Flandermeyer, *Science* 191, 96-98 (1976)
25. N. Bruchovsky und J.D. Wilson, *J. Biol. Chem.* 243, 2012-2021 (1968)
26. H. Koenig, C.Y. Lu und R. Bakay, *Biochem. J.* 158, 543-547 (1976)
27. C. Bonne und J.-P. Raynaud, *Steroids* 26, 227-232 (1975)
28. G. Schneider, *Diplomarbeit Universität München* (1986)
29. D.P. Byar, *Cancer* 32, 1126-1130 (1973)
30. F.P. Abramson und H.C. Miller, *J. Urol.* 128, 1336-1339 (1982)
31. M.M. Harpold, P.R. Dobner, R.M. Evans und F.C. Bancroft, *Nucleic Acids Res.* 5, 2039-2053 (1978)
32. R.A. Young und R.W. Davis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 1194-1198 (1983)
33. R.A. Young und R.W. Davis, *Science* 222, 778-782 (1983)
34. M.P. Calos, T.S. Lebkowski und M.R. Botchan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 3015-3019 (1983)
35. K.K. Stanley und P. Luzio, *EMBO J.* 3, 1429-1434 (1984)

36. A. Dugaiczik, H.W. Boyer und H.M. Goodman, *J. Mol. Biol.* 96, 171-184 (1975)
37. F. Scalenghe, E. Turco, J.E. Edström, V. Pirrotta und M. Melli, *Chromosoma* 82, 205-216 (1981)
38. J. Locker, *Anal. Biochem.* 98, 358-367 (1979)
39. J.M. Bailey und N. Davidson, *Anal. Biochem.* 70, 75-85 (1976)
40. H. Land, M. Grez, H. Hauser, W. Lindenmaier und G. Schütz, *Meth. Enz.* 100, 285-292 (1983)
41. U. Gubler und B.J. Hoffman, *Gene* 25, 263-269 (1983)
42. O. Westergaard, D. Brutlag und A. Kornberg, *J. Biol. Chem.* 248, 1361-1364 (1973)
43. P.S. Henthorn, M. Raducha, Y.H. Edwards, M.J. Weiss, C. Slaughter, M.A. Lafferty und H. Harris, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 1234-1238 (1987)
44. T.V. Huynh, R.A. Young und R.W. Davis in: *DNA cloning*, Volume I, D.M. Glover ed., IRL Press, Oxford (1985)
45. G. Frenette, J.Y. Dubé, C. Lazure, G. Paradis, M. Chrétien und R.R. Tremblay, *Prostate* 11, 257-270 (1987)
46. W.N. Burnette, *Anal. Biochem.* 112, 195-203 (1981)
47. F. Sanger, S. Nicklen und A.R. Coulson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467 (1977)
48. J. Messing, R. Crea und P.H. Seeberg, *Nucleic Acids Res.* 9, 309-321 (1981)
49. W. Hoehn, F.H. Schroeder, J.F. Riemann, A.C. Joebis und P. Hermanek, *Prostate* 1, 95-104 (1980)
50. D.J.A. Sutherland, E.C. Robins und J.W. Meakin, *J. Natl. Cancer Inst.* 52, 37-48 (1974)
51. J.R.G. Challis, C.K. Kim, F. Naftolin, H.L. Judd, S.S.C. Yen und K. Benirschke, *J. Endocrinol.* 60, 107-115 (1974)
52. H.D. Soule, J. Vazquez, A. Long, S. Albert und M. Brennan, *J. Natl. Cancer Inst.* 51, 1409-1413 (1973)
53. S.H. Corwin, M. Malament, M. Small und H.D. Strauss, *J. Urol.* 104, 745-748 (1970)

54. O.H. Pearson, *Cancer Res.* 17, 473-479 (1957)
55. H. Brendler, W.H. Chase und W.W. Scott, *Arch. Surg.* 61, 433-440 (1950)
56. G.R. Prout jr. und W.R. Brewer, *Cancer* 20, 1871-1878 (1967)
57. H.J. de Voogt, P.H. Smith, M. Pavone-Macaluso, M. de Pauw, S. Suciu und Mitglieder der "European Organization for Research on Treatment of Cancer Urological Group", *J. Urol.* 135, 303-307 (1986)
58. *Sportmedizin in der Praxis*, Hrsg. Alfred Aigner, Springer Verlag (1986), Seite 309
59. R.L. Parsons, J.L. Campbell und M.W. Thomley, *J. Urol.* 88, 812-813 (1962)
60. W.I.P. Mainwaring in: *Steroid Receptors and the Management of Cancer*, Vol. I, E.B. Thompson und M.E. Lippman ed., CRC Press, Boca Raton, Fla. (1979), pp. 99-112
61. P.D. Darbre und R.J.B. King, *Cell* 51, 521-528 (1987)
62. J. Gerdes, H. Lemke, H. Balsch, H.-H. Wacker, U. Schwab und H. Stein, *J. Immunol.* 133, 1710-1715 (1984)
63. G.J. van Steenbrugge, J.J. van Donge, F.H. de Jong, M.P.W. Gallee und F.H. Schroeder, *Urol. Res.* 14, 157 (1986)
64. M.P.W. Gallee, T.H. van der Kwast, F.J.W. ten Kate, T.W. Rijnders, J. Trapman, G.J. van Steenbrugge und P.J. Carpentier, *J. Urol.* 135, A 345 (1986)
65. C. Bonne und J.-P. Raynaud, *Steroids* 27, 497-507 (1976)
66. M. Hasenson, B. Hartley-Asp, C. Kihlfors, A. Lundin, J.-A. Gustafsson und A. Pousette, *Prostate* 7, 183-194 (1983)
67. G.J. van Steenbrugge, M.A. Blankenstein, J. Bolt-de Vries, J.C. Romijn, F.H. Schroeder und P. Vihko, *J. Urol.* 129, 630-637 (1983)
68. A.O. Brinkmann, G.G.J.M. Kuiper, W. de Boer, E. Mulder, J. Bolt, G.J. van Steenbrugge und H.J. van der Molen, *J. Steroid Biochem.* 24, 245-249 (1986)
69. A.O. Brinkmann, J. Bolt, G.J. van Steenbrugge, G.G.J.M. Kuiper, W. de Boer und E. Mulder, *Prostate* 10, 133-143 (1987)

70. T.C. Thompson, G.R. Cunha, J.M. Shannon und L.W.K. Chung, *J. Steroid Biochem.* 25, 627-634 (1986)
71. S. Ohno, L.N. Geller und E.V.Y. Lai, *Cell* 3, 235-242 (1974)
72. G.J. van Steenbrugge, M. Groen, J.C. Romijn und F.H. Schroeder, *J. Urol.* 131, 812-817 (1984)
73. M.P.W. Gallee, C.C. van Vrooningen, H.A. van der Katz, T.H. van der Kwast, F.J.W. ten Kate, J.C. Romijn und J. Trapman, *Prostate* 9, 33-45 (1986)
74. L. Williams, C. McDonald und S. Higgins, *Nucleic Acids Res.* 13, 659-672 (1985)
75. M.J. Page und M.G. Parker, *Cell* 32, 495-502 (1983)
76. E. Mulder, A.A. Vrij, A.O. Brinkmann, H.J. van der Molen und M.G. Parker, *Biochim. Biophys. Acta* 781, 121-129 (1984)
77. K.S. Zaret und K.R. Yamamoto, *Cell* 38, 29-38 (1984)
78. A.C.B. Cato, S. Geisse, M. Wenz, H.M. Westphal und M. Beato, *EMBO J.* 3, 2771-2778 (1984)
79. C. Huggins und C.V. Hodges, *Cancer Res.* 1, 293-297 (1941)
80. S.J. Segal, H. Marberger und R.H. Flocks, *J. Urol.* 81, 474-478 (1959)
81. J.G. Williams in: *Genetic engineering*, Vol. 1 p. 2, ed. R. Williamson, Academic Press, New York (1981)
82. J. Lindgren, K.Y. Pak, C. Ernst, G. Rovera, Z. Stepkowski und H. Koprowski, *Hybridoma* 4, 37-45 (1985)
83. J.J. Starling und G.L. Wright Jr., *Cancer Res.* 45, 804-808 (1985)
84. M.E. Kaighn, K.S. Narayan, Y. Ohnuki, J.F. Lechner und L.W. Jones, *Invest. Urol.* 17, 16-20 (1979)
85. K.R. Stone, D.D. Mickey, H. Wunderli, G.H. Mickey und D.F. Paulson, *Int. J. Cancer* 21, 274-281 (1978)
86. L. Velluz, G. Nominé, R. Bucourt und J. Mathieu, *C. R. Acad. Sci.* 257, 569-570 (1963)
87. C. Auffray und F. Rougeon, *Eur. J. Biochem.* 107, 303-314 (1980)
88. R.J. McDonald, A.E. Przybyla und W.J. Rutter, *J. Biol. Chem.* 252, 5522-5528 (1977)

89. K.S. Kirby, Meth. Enz. 12 B, 87-99 (1968)
90. H. Aviv und P. Leder, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 1408-1412 (1972)
91. J.M. Chirgwin, A.E. Przybyla, R.J. McDonald und W.J. Rutter, Biochem. 18, 5294-5299 (1979)
92. T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory (1982)
93. P. Blackburn, J. Biol. Chem. 254, 12484-12487 (1979)
94. T.F. Walseth und R.A. Johnson, Biochim. Biophys. Acta 562, 11-31 (1979)
95. J.G. Sutcliffe, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43, 77-90 (1978)
96. M.C. Wang, L.A. Valenzuela, G.P. Murphy und T.M. Chu, Invest. Urol. 17, 159-163 (1979)
97. M. Dagert und S.D. Ehrlich, Gene 6, 23-28 (1979)
98. H.C. Birnboim und J. Doly, Nucleic Acids Res. 7, 1513-1527 (1979)
99. W.D. Benton und R.W. Davis, Science 196, 180-182 (1977)
100. H.O. Smith und D. Nathans, J. Mol. Biol. 81, 419-423 (1973)

7. ABKÜRZUNGEN

PSA	Prostata-spezifisches Antigen
PAP	Prostata-spezifische Saure Phosphatase (E.C. 3.1.3.2.)
MMTV	Mouse Mammary Tumor Virus
kD	Kilodalton
bp	Rasenpaare
kb	Kilobasen (= 1000 bp)
DES	Diethylstilbestrol
DESMF	DES-Monophosphat
DESDP	DES-Diphosphat
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
R1881	Methyltrienolon
DHT	Dihydrotestosteron
EDTA	Ethylen-diamino-tetra-acetat
CDTA	Cyclohexyl-diamino-tetra-acetat
SDS	Natrium-dodecyl-sulfat
Tris	Tris-hydroxymethyl-amino-methan
Boe	Boehringer Mannheim
P 100	Petrischale mit 100 mm Durchmesser
X-gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -D-galacto- pyranosid
IPTG	Iso-propyl-thio-galactosid
cpm	Impulse pro Minute
K _d	Dissoziationskonstante
h	Stunde(n)
SSC	Standard-Saline-Citrat (15 mM Na ₃ -Citrat, 150 mM NaCl)
SM	Phagenpuffer nach Ref. 92
Ref.	Referenz
DNAase	Desoxyribonuklease
RNAase	Ribonuklease
HS	Hypersensitive Stelle
oD	optische Dichte
A ₂₆₀	Extinktion bei 260 nm und 1 cm Schichtdicke
A ₂₆₀ -Einheit	Substanzmenge in 1 ml Lösung, die eine A ₂₆₀ von 1 verursacht

Die Bezeichnung der Restriktionsnukleasen richtet sich nach Ref. 100.

Lebenslauf

Name: Schulz
Vorname: Peter
Geburtsdatum: 05. 08. 1954
Geburtsort: Olching
Name des Vaters: Schulz, Holdreich, geb. 29. 04. 1911
Beruf: Bundesbahnbeamter i. R.
Name der Mutter: Schulz, Christel, geb. 25. 12. 1923
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch
Konfession: evangelisch-lutherisch
Schulbildung: Grundschule (Gotzinger Schule) in München: 1960-1964
Gymnasium in München: 1964-1970 Klenze-Gymnasium und 1970-1973 Dante-Gymnasium
Hochschulstudium: Ludwig-Maximilians-Universität München
Studiengang: Diplom-Biologie
Beginn: 1973
Diplomprüfung: 1978
Diplomarbeit: 1978-1979, Institut für Physiologische Chemie der Universität München, Priv. Doz. Dr. F. Fittler
Zivildienst: April 1979 - Juni 1980
Promotion: seit November 1980 molekularbiologische Arbeiten im Institut für Physiologische Chemie der Universität München, seit Februar 1981 Bearbeitung des Themas der vorliegenden Arbeit, Prof. Dr. F. Fittler

